

明治大学大学院農学研究科

2013 年度

博士学位請求論文

乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* により
生成される血圧降下ペプチドに関する研究

Studies on the Milk Protein derived Antihypertensive Peptides
Produced by *Lactobacillus helveticus*

学位請求者

前野正文

乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* により
生成される血圧降下ペプチドに関する研究

Studies on the Milk Protein derived Antihypertensive
Peptides Produced by *Lactobacillus helveticus*

前野正文

目 次

第 1 章 緒 論	1
1-1.高 血 圧 と そ の 課 題	1
1-2.高 血 圧 発 症 の メ カ ニ ズ ム	3
1-3.食 品 由 来 の 血 圧 降 下 ペ プ チ ド	4
1-4.発 酵 乳 の 生 理 機 能 研 究 の 歴 史	6
1-5.発 酵 乳 の 血 圧 降 下 作 用	7
1-6. <i>L. helveticus</i> の タ ン パ ク 質 分 解 系 と 血 圧 降 下 ペ プ チ ド	10
1-7. <i>L. helveticus</i> 発 酵 乳 の 安 全 性	13
1-8. <i>L. helveticus</i> 発 酵 乳 の 食 品 応 用 に 関 す る 課 題	15
1-9.本 論 文 の 目 的 と 構 成	16
1-10.参 考 文 献	26
第 2 章 カゼイン分解物からの血圧降下ペプチドの単離同定	34
2-1.緒 言	34
2-2.材 料 と 実 験 方 法	36
2-2-1.試 薬	36
2-2-2.菌 体 外 プ ロ テ ア ー ゼ の 調 製	36
2-2-3.カゼインからのペプチド混合物の調製	37
2-2-4.ラットの血圧測定方法	37
2-2-5.ACE 阻 害 活 性 の 測 定	38
2-2-6.逆 相 HPLC を 使 用 し た 血 圧 降 下 ペ プ チ ド の 精 製	38
2-2-7.ペプチドの配列分析及び化学合成	39
2-3.結 果	40
2-3-1.血 圧 降 下 フ ラ ク シ ョ ン か ら の ペ プ チ ド の 単 離 精 製	40
2-3-2.主 要 ペ プ チ ド の 血 圧 降 下 活 性 と 、 ACE 阻 害 活 性	40
2-3-3.有 効 ペ プ チ ド の 血 圧 降 下 作 用 の 経 時 変 化	41
2-3-4.有 効 ペ プ チ ド の 血 圧 降 下 作 用 の 用 量 依 存 性	41

2-4.考 察	49
2-5.参 考 文 献	50
第 3 章 血 圧 降 下 ペ プ チ ド の 作 用 メ カ ニ ズ ム 解 析	53
3-1.緒 言	53
3-2.材 料 と 実 験 方 法	55
3-2-1.試 薬	55
3-2-2.ラ ッ ト の 血 圧 測 定 方 法	55
3-2-3.ACE 阻 害 活 性 の 測 定	56
3-2-4.ペ プ チ ド の 人 工 消 化 試 験	56
3-2-5.人 工 消 化 物 の 逆 相 HPLC に よ る 分 析	57
3-2-6.ペ プ チ ド の 配 列 分 析 及 び 化 学 合 成	57
3-3.結 果	59
3-3-1.血 圧 降 下 ペ プ チ ド の 人 工 消 化 試 験	59
3-3-2.生 成 し た ペ プ チ ド の 血 圧 降 下 作 用 の 経 時 変 化	60
3-3-3.生 成 し た ペ プ チ ド の 血 圧 降 下 作 用 の 用 量 依 存 性	60
3-3-4.生 成 し た ペ プ チ ド の 活 性 中 心 の 評 価	60
3-4.考 察	65
3-5.参 考 文 献	68
第 4 章 発 酵 乳 か ら の 血 圧 降 下 ペ プ チ ド の 単 離 同 定	72
4-1.緒 言	72
4-2.材 料 と 方 法	74
4-2-1.試 薬 と 微 生 物	74
4-2-2.発 酵 乳 ホ エ ー の 調 製	74
4-2-3.ラ ッ ト の 血 圧 測 定 方 法	74
4-2-4.ACE 阻 害 活 性 の 測 定 方 法	75
4-2-5.固 相 カ ラ ム お よ び 逆 相 HPLC を 使 用 し た 血 圧 降 下 ペ プ チ ド の 精 製	76

4-2-6.血圧降下ペプチドの定量分析	76
4-2-7.血圧降下ペプチドの同定と化学合成	77
4-3.結果	78
4-3-1.発酵乳ホエーからの血圧降下フラクションの限定	78
4-3-2.血圧降下ペプチドの同定とACE阻害活性	78
4-3-3.SHRに経口投与したときの血圧降下作用	79
4-3-4.発酵乳中の血圧降下ペプチドの生成量	80
4-4.考察	86
4-5.参考文献	89
 第5章 <i>L. helveticus</i> 発酵乳の安全性評価	 92
5-1.緒言	92
5-2.材料と方法	96
5-2-1.染色体異常試験	96
5-2-1-1.試験サンプル	96
5-2-1-2.細胞株	96
5-2-1-3.試験方法	96
5-2-1-4.観察および評価項目	99
5-2-2.単回及び反復投与試験	99
5-2-2-1.試験サンプル	99
5-2-2-2.試薬と実験動物	100
5-2-2-3.試験方法	100
5-2-2-4.観察および評価項目	101
5-3.結果	102
5-3-1.染色体異常試験	102
5-3-2.単回投与試験	102
5-3-3.反復投与試験	102
5-4.考察	115
5-5.参考文献	117

第 6 章 総括と展望	119
-------------	-----

謝辞	126
----	-----

Appendix	
----------	--

内 容 の 要 旨

厚生労働省の平成 23 年度患者調査によると、高血圧患者数は約 900 万人であり、平成 20 年度の前回調査から約 100 万人増加した。高血圧症の予備軍である正常高値血圧者も含めるとその数は 5000 万人とも推定され、早急な対策が必要である。血圧は、加齢とともに上昇するが、脳卒中や心筋梗塞などの発症リスクも高まるため、血圧上昇を抑えるための対策が必要である。それには運動や食事など生活習慣の改善が推奨されるが、予防効果を高めるために、血圧降下作用などの機能性を持つ食品の活用が期待されている。

食品成分でもあるペプチドは、アミノ酸が数個から数十個結合した物質だが、その組み合わせにより、血圧降下作用などの様々な生理活性を持つために、機能性食品への応用が期待できる。ペプチドは、一般的には、乳タンパク質をはじめとする食品タンパク質を消化酵素などで分解して製造されるが、苦味を呈するペプチドの生成により嗜好性の低下が懸念される。一方で、発酵乳は、乳酸菌のプロテアーゼの作用で乳タンパク質が分解されて様々なペプチドを含有しており、風味良好なペプチド素材として有望である。なかでも、乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* は、他の乳酸菌に比べてタンパク質分解活性が強く、多くのペプチドを産生する。これまでも、*L. helveticus* を含むスターターを用いて 37℃ で 24 時間発酵させた発酵乳から、血圧降下作用をもつアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害ペプチドである Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro が見出されてきた。この発酵乳は、発酵で生じた乳酸が強い酸味を呈するために、直接飲用が困難なことが課題であった。一方で、発酵を 10 時間程度で止めて酸味を抑えた *L. helveticus* 発酵乳や、*L. helveticus* から精製したプロテアーゼでカゼインを直接分解したペプチドにも、自然発症高血圧ラット(SHR)への経口投与で血圧降下作用が示されたため、風味良好な機能性食品開発の可能性が示された。しかし、いずれの素材も、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含有しておらず、血圧降下作用を示す活性本体は明らかになっていない。

さらに、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含んだ酸味の強い *L. helveticus* 発酵乳についても、乳酸を低減した粉末化素材が開発された。これによっても酸味の影響を回避した食品開発への可能性が広がったが、原料発酵乳由来の様々な成分が濃縮されたため、過剰摂取を想定した安全性を考察する必要が生じた。

本研究では、機能性食品に利用可能な風味良好な血圧降下ペプチド素材の開発に向けて、*L. helveticus* が生成する Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro 以外の血圧降下ペプチドの存在と、その作用メカニズムを明らかにして、機能性食品への利用可能性を探る基礎的知見を得ることを第一の目的とした。次に、*L. helveticus* 発酵乳の乳酸低減粉末の実用化に向けた一助とすべく、本粉末素材について、動物細胞および動物を用いて安全性に関する基礎知見を得ることを第二の目的とした。

第 1 章 緒 論

第 1 章では、*L. helveticus* 発酵乳の血圧降下作用を持つ機能性食品としての有用性と課題をレビューした。

血圧調節メカニズムのひとつとして、レニン-アンジオテンシン系があり、キー酵素が ACE である。ACE 阻害による血圧調節は、1970 年代初頭、蛇毒から見出された ACE 阻害ペプチドが、高血圧患者への静脈投与で、血圧降下作用を生じたことから注目された。

各種乳酸菌による発酵乳を比較した結果、ペプチド含有量が高いものほど、ACE 阻害活性も高いことが示され、これらの発酵乳を SHR に投与すると、*L. helveticus* 特異的に血圧降下作用が認められた。*L. helveticus* 発酵乳の ACE 阻害活性は、対数増殖期後期から急激に増加し、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、その活性を指標に見出された。これらペプチドは、カゼインが *L. helveticus* のプロテアーゼで断片化された後に、ペプチダーゼの分解を受けることで生成されるが、ペプチダーゼ活性の低い発酵前期の段階や、*L. helveticus* から抽出した菌体外プロテアーゼによるカゼイン分解物も、SHR で顕著な血圧降下作用があったことから、*L. helveticus* は、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro 以外にも、血圧降下ペプチドを生成している可能性が強く示唆されていた。

安全性については、*L. helveticus* 発酵乳は、日本で 90 年以上の食経験があるが、動物やヒトでの安全性評価も行われた。*L. helveticus* 発酵乳を、ICR マウスへ 4 週齢から投与した結果、対照群より平均寿命が有意に 8% 延長した。その理由として腫瘍、腎障害、感染症などの遅延が示唆されたため、安全性に加え、健康効果を保有する可能性も示された。ヒト試験では、健康な成人への過剰摂取および血圧への影響や、高血圧患者での評価が行われ、いずれも安全性に問題ないことが示された。

以上のように、*L. helveticus* 発酵乳は、安全性も高く、血圧降下作用をはじめとする様々な健康機能性を持つ可能性がある有望素材であることが示されていた。

第 2 章 カゼイン分解物からの血圧降下ペプチドの単離同定

本研究では、乳酸菌 *L. helveticus* CP790 株から単離精製した菌体外プロテアーゼによる乳カゼイン分解物から血圧降下作用を持つ有効成分の同定を行った。

最初に、ACE 阻害ペプチドの可能性を再確認した。分解物を逆相 HPLC で分画し、それぞれの ACE 阻害活性を測定した。ACE 阻害活性は IC₅₀ 値(酵素活性を 50% 阻害するペプチド濃度)とした。しかし、いずれの分画物も ACE 阻害活性は非常に低かった。そこで、ACE 阻害活性が弱い血圧降下ペプチドを単離するため、従来の方法とは異なり、SHR への経口投与による血圧降下作用を指標に、有効成分を直接絞り込んだ。すなわち、逆相 HPLC での分画物を SHR に経口投与し、tail-cuff 法にて血圧値を測定した。最も血圧降下作用が高かった分画を、逆相 HPLC を用いて精製を繰り返した結果、最終的に 10 種類の主要ペプチドを単離し、エドマン法による N 末端分析と、アミノ酸組成分析により、各配列を決定した。これらのペプチドを固相法により合成し、SHR に経口投与して降圧値を調べたところ、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の配列を持つペプチドの降圧作用が最も強かった。カゼイン分解物中の本ペプチドの含有量を定量した結果、26 µg / ml であった。さらに、本ペプチドは、SHR への経口投与において、0.5～2.0 mg / kg 体重の投与に降圧作用が認められた。以上の結果から、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、*L. helveticus* CP790

株の菌体外プロテアーゼによるカゼイン分解物の血圧降下作用の主要成分であることが示された。

第 3 章 血圧降下ペプチドの作用メカニズム解析

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、ACE 阻害活性がほとんど認められなかったため、経口投与後のペプチドの消長を探ることから作用メカニズムを推定すべく、人工消化試験を実施した。その結果、本ペプチドをカルボキシペプチダーゼ A で消化すると、ACE 阻害活性が顕著に上昇することが認められた。分解されたペプチドを逆相 HPLC で単離して分析した結果、本ペプチドの C 末端の Gln 残基が分解された Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro が同定された。このペプチドの ACE 阻害活性 (IC₅₀) は 5 μ M であり、分解前のものと比較して活性が 200 倍以上に上昇した。従って、本ペプチドは経口投与後に消化管内で分解を受けて活性が出現する可能性が示された。さらに Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro を SHR に経口投与して、血圧降下作用を評価した結果、分解前の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と同様に血圧降下作用を示した。

一方、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro には、ACE 阻害作用を示す配列が内在している可能性があったため、N 末端、C 末端からアミノ酸残基ひとつずつ削減したペプチドを合成して ACE 阻害活性を測定した。しかし、いずれの合成ペプチドも ACE 阻害活性が低下したために、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro が、活性本体であることが示された。

第 4 章 発酵乳からの血圧降下ペプチドの単離同定

本研究では、*L. helveticus* CP790 株から派生した酸生成力の弱い変異株 *L. helveticus* CPN4 株を用い、発酵初期段階である pH4 付近で止めて一般的なヨーグルトと同等の酸味に改良した発酵乳を用いた。

このヨーグルト様発酵乳は、ACE 阻害活性が弱いことから、有効性成分は Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln だと推察されたが、定量の結果、有効量は含まれておらず、他の有効成分が存在する可能性が示された。そこで、SHR への経口投与による血圧降下作用を指標に活性成分の単離同定を行った結果、顕著な血圧降下作用を持つ新規ペプチド Tyr-Pro を見出した。Tyr-Pro を SHR に経口投与すると、0.1~10 mg/kg 体重の投与

で、血圧降下作用を示した。本ヨーグルト様の発酵乳における Tyr-Pro 含有量は 8.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であった。また、Tyr-Pro は ACE 阻害活性が 720 μM と非常に弱いことから、血圧降下作用発揮には別のメカニズムがある可能性が推察された。

第 5 章 *L. helveticus* 発酵乳の安全性評価

L. helveticus 発酵乳のホエー成分を粉末化すると、血圧降下作用を発揮するペプチド以外にも、発酵由来の様々な成分が濃縮される。本粉末素材は、発酵乳原料の食経験から安全性は高いことが想定されるが、血圧降下ペプチドを含めた発酵生産物全体の過剰摂取安全性を考察するために、特定保健用食品で原則求められる遺伝毒性(染色体異常試験)、急性毒性(単回投与試験)及び、亜急性毒性(28日間反復投与試験)を実施し、安全性に係る用量と反応を評価した。発酵乳製造には、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の生産能力が高いことで選抜された *L. helveticus* CM4 株を用いた。

その結果、チャイニーズハムスターの肺由来の繊維芽細胞を用いた染色体異常試験では、本素材に起因すると推察される変化は見られなかった。単回投与試験では、試験系の最大量(4000 mg / kg 体重)を SD ラットに経口投与したが、本素材が起因と判断される変化は見られなかった。本粉末素材を 4000 mg / kg 体重で投与したときの用量は、Val-Pro-Pro 換算でヒト有効量と比較して 100 倍量に相当した。28 日間の反復投与試験においては、SD ラットへの投与量は、500, 1000, 2000 mg / kg 体重の 3 用量としたが、いずれの用量も本素材投与が起因と判断される変化は見られなかった。以上の結果より、*L. helveticus* 発酵乳のホエー成分を乳酸低減後に粉末した食品素材の安全性は高いことが示された。

第 6 章 総括と展望

本研究において、*L. helveticus* の菌体外プロテアーゼを利用したカゼイン分解物と、ヨーグルト様発酵乳において、それぞれ Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と Tyr-Pro のペプチドが血圧降下作用を発揮する主要成分であることを見出した。これらペプチドは、本カゼイン分解物とヨーグルト様発酵乳を風味良好な機能性食品として実用化する際の有効成

分としての活用が期待できる。また、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln はプロテアーゼ単独の分解で生成されるために、プロテアーゼとペプチダーゼの併用が必要な Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro よりも、製造方法の単純化や安定化が期待できる。そこで、今後は、様々な食品素材や酵素分解物中の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln ペプチドを分析して生成方法を研究し、より効率的で安価に製造する技術開発を行う価値があると考ええる。

また、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、消化酵素で分解されて ACE 阻害作用を発揮する、プロドラッグタイプのペプチドであることを見出した。この知見は、新規機能性ペプチドを探索する際のひとつの着眼点を提供する、重要な知見と考える。Tyr-Pro は、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と同程度の血圧降下作用を持つが、ACE 阻害作用が弱いために他の作用メカニズムも持つ可能性が示された。ACE 阻害以外の血圧降下メカニズムとしては、交感神経の抑制作用が知られており、Tyr-Pro は、別の研究で、ラットへの交感神経系の抑制作用が見出されている。しかし、血圧降下作用との関係は不明であるために、今後はこれらの関係を詳細に調べる必要があると考える。

また、*L. helveticus* が生成するその他成分を含めた安全性についても、正常ラットを用いた遺伝毒性、急性および亜急性毒性を評価した結果、いずれも投与に起因する毒性はなく、安全性が高いことが考察された。

本研究で得られた以上の知見は、血圧降下作用をはじめとする、風味良好な機能性食品開発に向けた研究および、実用化のための技術開発に重要な基礎的知見であると考ええる。

第 1 章 緒論

1-1. 高血圧とその課題

日本人の成人では、収縮期血圧が 140 mmHg 以上、または拡張期血圧が 90 mmHg 以上になると、高血圧と診断される(表 1-1)。この高血圧の患者数は、平成 23 年度の調査[厚生労働省, 2012a]によると、調査した疾患のなかで第 1 位の約 900 万人であり、平成 20 年度の前回調査と比較して約 100 万人も増加した。さらに、潜在的な高血圧者数およびその予備軍の人数については、平成 18 年度の国民健康・栄養調査報告に記載があり、高血圧症の有病者は約 3970 万人、正常高値血圧者は約 1520 万人であり、合わせて約 5490 万人になると推計されている[厚生労働省, 2008]。この人数は、日本の人口の約半数を占めることから、高血圧は日本人の国民病ともいえる存在である。

高血圧症の有病率は、20 歳代では 10%未満で少ないが、年齢とともに上昇して、70 歳以上では 70%を超える(図 1-1) [厚生労働省, 2008]。血圧値が高い状態が継続すると、脳卒中や心筋梗塞、動脈硬化などの循環器系疾患の発症リスクが高まるために、高血圧症は積極的に治療する必要がある。さらに、それに加えて血圧値が正常値の範囲内にある若い年齢からでも予防対策に取り組むことで、加齢による血圧上昇をできるだけ抑えることが求められている。血圧値の低下と、循環器系疾患のリスク低減の関係性については、疫学的な調査研究が行われ、その有効性が報告された[健康日本 21, 2000]。それによると、国民の収縮期血圧の平均値がわずか 2 mmHg 低下するだけでも、脳卒中死亡者は約 1 万人減少し、同時に虚血性心疾患の死亡者も減少させることが可能になり、循環器疾患全体では約 2 万人の死亡が予防できると算出されている(表 1-2)。

高血圧症の患者数の増加は、日本だけではなく、世界的にも問題になっている。WHO(世界保健機関)は、25 歳以上で高血圧症と診断される人は、2008 年に世界で 10 億人を超え、世界の 25 歳以上人口の 3 人に 1 人が該当するという調査結果[WHO, 2013]を発表した。さらに WHO では、高血圧への対処は、若い世代から行う必要があると報告している。

一方で、日本国全体の医療費の総額は、2010年度で37兆4202億円であり、前年度の36兆67億円に比べ1兆4135億円、3.9%の増加となった[厚生労働省, 2012b]。そのうち歯科診療や調剤薬局での医療費を除いた、いわゆる医師にかかった費用に相当する医科診療費は、27兆2228億円であるが、その内訳をみると、第1位が高血圧性疾患を含む循環器疾患(5兆6601億円)であり、医科診療費全体の20%を占めていた。そして、日本国における医療費は、高齢者人口の増加に伴って年々増加しているため、加齢とともに有病率が増加する高血圧は、治療に加えて予防に対しても取り組むことで、患者数減少と、医療費抑制の両方を目指す必要がある。

高血圧症には、高血圧症患者の約90%を占める本態性高血圧症と、その他、別の疾患により生じる二次性高血圧症の2種類がある。そのうち本態性高血圧症は、原因は明らかではないが、遺伝や生活習慣、塩分摂取量などの食習慣、加齢などさまざまな要因がからみあって発症することから、生活習慣病のひとつとして捉えられている。血圧値の低下や、血圧上昇抑制のために行われる対策は2段階になっており、最初の段階は、運動の推進や禁煙をはじめとする生活習慣改善の指導および、塩分摂取の制限や野菜類の摂取推進などの食生活改善の指導を中心とした非薬物療法である。そして、それで十分な降圧作用が得られない場合は、2段階目の対策として、降圧剤を用いた薬物療法が行われる[日本高血圧学会, 2009]。

高血圧症は、動脈硬化、脳卒中、心筋梗塞など様々な循環器疾病につながる危険な疾患である。しかし、高血圧の状態は自覚症状に乏しいために、対象者に高血圧症の治療や予防への意識を高めることや、高血圧症への対策を継続させることが難しい。そこで、高血圧症への対策がより手軽にかつ、効果的に行うことができる方法が求められているが、そのひとつの手段として、血圧降下作用を持つ成分を含む食品の活用が期待されている。特定保健用食品の利用については、「高血圧治療ガイドライン 2009」において、生活習慣の修正の教育・指導に関する項目の中にも記載された[日本高血圧学会, 2009]。

1-2. 高血圧発症のメカニズム

血圧調節のメカニズムには、レニン・アンジオテンシン系、交感神経系、バソプレッシン系など血圧を上昇させるシステムや、キニン・カリクレイン系、プロスタグランジン系、ナトリウム利尿ペプチド系などの血圧を下げるシステムなどの、複数のシステムが並行して存在する。生体では、これらがバランスをとって血圧の恒常性を保っていると考えられている。

そのうち、血圧上昇に大きな影響を及ぼすのがレニン・アンジオテンシン系(図 1-2)であり、昇圧物質としてペプチド成分が関わっている。すなわち、腎臓で分泌されるプロテアーゼのレニンが、肝臓で合成されたアンジオテンシノーゲンを部分分解してアンジオテンシン I(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)が生成される。アンジオテンシン Iには、血圧上昇作用はないが、それがさらに、肺や血管内皮に存在するアンジオテンシン変換酵素(ACE)によって C 末端の His-Leu が分解されることで、強力な血圧上昇作用を持つアンジオテンシン II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)が生成される [Skeggs, 1956]。

一方、ACE は、血圧低下作用を持つペプチドホルモンのブラジキニンを分解して失活させる作用も持つために、血圧上昇作用をさらに強力に発揮させる [Erdos, 1975]。

アンジオテンシン II の血圧上昇メカニズムは、次の通りである。すなわち、アンジオテンシン II は、動脈壁や腎臓、尿細管などに存在するレセプター(AT1 受容体)に結合して、血管平滑筋の収縮や、副腎皮質からのアルドステロンの合成・分泌を促進して、腎臓でのナトリウムの体内貯蔵を促すとともに、抗利尿ホルモンであるバソプレッシンの分泌も促進し、水分再吸収の促進により体内の体液量を増加させることで血圧上昇を促す。さらに、アンジオテンシン II は、血管壁肥厚も促すために、動脈硬化の原因にもなっている [Peach, 1977]。

このレニン・アンジオテンシン系における血圧上昇作用のキー酵素である ACE は、活性中心に亜鉛イオンを持つカルボキシペプチダーゼの一種であり、アンジオテンシン I の C 末端を認識して His-Leu を分解してアンジオテンシン II に変換する (図 1-3)。従って、アンジオテンシン I

の C 末端側よりも親和性の高いペプチドがあれば、拮抗的に阻害作用を発揮し、ACE の活性を低下させることが期待できる。1970 年代初頭、Ondetti らは、蛇毒から ACE を阻害するペプチドを見出し [Ondetti, 1977]、特に、9 アミノ酸残基から成る ACE 阻害ペプチド (<Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro) が、高血圧患者への静脈投与により、血圧降下作用を発揮することを確認した。しかし、本ペプチドは、化学合成が困難であったことと、体内で分解を受けやすいために静脈投与でしか効果が期待できなかったことが課題であった。そこで Ondetti らは、本 ACE 阻害ペプチドが、C 末端に Pro 残基を有することが ACE 阻害活性発現に関与していることに注目して、末端に Pro の構造を配置した経口投与でも降圧作用が期待できる ACE 阻害薬「カプトプリル (D-2-メチル-3-メルカトプロパノイル-L-プロリン)」を開発した [Ondetti, 1977]。ACE とアンジオテンシン I、阻害薬、蛇毒由来ペプチドとの結合モデルについては図 1-3 に示した。

これら一連の研究の結果から、自然界に存在する天然のペプチドにも、ACE 阻害作用やヒトでの血圧降下作用を発揮するものがあることが明らかになった。このことが、食品由来ペプチドから血圧降下作用を発揮するペプチドの探索研究が進められるきっかけにもなったと考えられる。

1-3. 食品由来の血圧降下ペプチド

ペプチドは、アミノ酸が数個から数十個結合した物質であるが、アミノ酸の組み合わせによって、様々な生理機能を発揮する。このような機能性ペプチドは、食品原料のなかでも、乳タンパク質から数多く見出されていることから、乳タンパク質は、機能性ペプチドの配列を内在する可能性が高い素材と言える (表 1-3)。一方、血圧降下作用が期待される ACE の阻害活性をもつ機能性ペプチドは、*in vitro* での評価方法 [Cushman, 1971] を活用することで、乳タンパク質 [Karakci, 1990 ; Maruyama, 1987a, 1987b, 1985] 以外にも、鰹節 [Matsumura, 1993; Yokoyama, 1992]、トウモロコシ [Maruyama, 1989]、菜種種子 [Marczak,

2003]、米タンパク質[Li, 2007]など様々な食品タンパク質から見出されている。

ACE 阻害ペプチドをはじめとする機能性を持つペプチドを調製するためには、一般的にはプロテアーゼ製剤による加水分解が用いられる。但しこの方法は、元々タンパク質内部に存在した疎水性アミノ酸を多く含んだ部分を露出させることが多い。疎水性アミノ酸を多く含むペプチドは、苦味を呈するために[Habibi-Najafi, 1996]、得られた分解物を食品として利用する際には、嗜好性の低下が懸念される。そこで、プロテアーゼ製剤による加水分解を行ったペプチドを産業利用する際には、苦味を低減させることが課題となっていた[Matsui, 2000]。

一方で、これらの食品から見出された天然物由来ペプチド群に含まれる ACE 阻害ペプチドは、含有量が微量で現実的な経口摂取量では十分な効果が期待出来ないものや、ACE 阻害作用を持つペプチドのなかには、*in vitro* 試験で見かけ上は ACE 阻害活性を示すが、*in vivo* 試験では血压降下作用を示さないものも報告されている[Fujita, 1999]。従って、ACE 阻害作用が見出されたペプチドの全てが、血压降下作用を期待した機能性食品に応用可能とは限らない。その理由は、*in vitro* で強い ACE 阻害作用を持つペプチドであっても、摂取後に消化酵素で分解されて活性が消失してしまうことや、消化酵素の分解を免れても、腸管からの吸収性が低く、体内に有効量が移行できないことなどが考えられている[吉川, 1993]。従って、*in vitro* 試験により見出された新規な ACE 阻害ペプチドは、消化酵素からの分解耐性や、実際に *in vivo* でも血压降下作用を示すかどうか検証する必要があると考えられる。

In vivo での試験には、ラットなどの実験動物が用いられる。それらの実験動物において高血圧状態を再現するためには、手術や、薬剤投与などの手法があるが、安定した再現性を得るためには、遺伝的に高血圧を発症する疾患モデル動物の活用が有用である。代表的なモデル動物としては、遺伝的に高血圧を自然発症する系統のラットである SHR (Spontaneously Hypertensive Rat)や、さらに SHR から分離された脳卒中を発症しやすいラットである SHRSP(Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat)がある。他にも、食塩感受性高血圧を発症する Dahl ラットが知られている[Uehara, 2009; 勝谷, 2000]。

ラットの血圧の測定方法は、尾動脈の血圧値を人間の家庭用の血圧計と同様の原理で加圧して測定する tail-cuff 法が広く用いられる。この方法は、無麻酔で評価可能であり、大動脈へのカニューレーション等の手術も必要としないために、動物個体への負荷が少なく、数ヶ月にわたる血圧値測定など、長期間の試験に利用できる。従って、食品由来の血圧降下ペプチドの探索には、主に、SHR への経口投与と、tail-cuff 法による血圧測定が用いられる。

1-4. 発酵乳の生理機能研究の歴史

人類の発酵乳利用に関する歴史は、紀元前 5000 年までさかのぼると言われている。発酵乳は、乳を木桶や皮袋の容器に入れて保存した際に、それら容器に付着していた乳酸菌の自然発酵で生じたと考えられている[森, 2007]。乳酸菌は、乳中の乳糖を資化して乳酸を生成することで乳の pH を低下させ、腐敗菌の増殖を抑えることで、貴重な食料である乳の保存性を高めることができる。さらに、発酵乳は、乳酸菌が生成する香気成分や、乳タンパク質が分解されて生じたアミノ酸やペプチドの呈味成分の作用により独特の風味が付与されているために、嗜好性も高い。発酵乳は、上記のように保存性と嗜好性の 2 つの利点を持つことから、牧畜文化の広がりとともに世界中に広まっていった[久住, 2013]。

一方で、発酵乳の生理機能が注目されたのは、20 世紀初頭になってからである。それは、ロシア出身の免疫学者でパスツール研究所のメチニコフ(1845-1916)が、自身の著書「The prolongation of life: Optimistic Studies」[Metchnikoff, 1908]のなかで、発酵乳摂取が寿命延長に関係すると報告した事からはじまった。これが、いわゆる“不老長寿説”である。以降、この事がきっかけとなって発酵乳や乳酸菌の生理機能の研究が世界中で活発化し、多大な関心が寄せられた。その結果、多くの研究結果が報告された[高野, 1996] (表 1-4)。

発酵乳の寿命延長効果については、乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* を含むスターターで乳を 24 時間発酵して得られた発酵乳を ICR マウスに終生投与する試験で調べられた[新井, 1980]。試験群は、*L. helveticus*

発酵乳を含む飼料、全脂乳を含む飼料、基礎飼料のみを与えた群の 3 群が設定された。その結果、*L. helveticus* 発酵乳を含む飼料を摂取した群の平均寿命が、他の 2 群に比べ有意に延長する結果を得た(図 1-4)。剖検の結果、*L. helveticus* 発酵乳を含む飼料の摂取群は、腎障害や腫瘍の遅延がみられていた。一方で、高肉食で腎病変を呈する APA ハムスターに *L. helveticus* 発酵乳を与えて飼育する実験では、腎病変の進行が抑制されたことから、*L. helveticus* 発酵乳が、循環器系に対して好影響を与えていることが推察された[和田, 1985]。

そこで、高血圧モデルラットである SHR を用いて、*L. helveticus* 発酵乳摂取が血圧に与える影響が調べられた。SHR は若齢時には血圧が正常だが、成長に伴って血圧が上昇する特性を持つ。そこで、*L. helveticus* 発酵乳を含む飼料を、SHR の血圧が正常である 7 週齢から継続的に摂取させたところ、13 週齢以降で、*L. helveticus* 発酵乳配合飼料を摂取したラットは、対照群に比べて血圧値の上昇が抑えられ、21 週齢以降で有意な差を示した[Nakamura, 1996]。さらに、高血圧状態に達した SHR に対して、*L. helveticus* 発酵乳を単回経口投与して、血圧の変化を調べた実験では、投与 2 時間後に有意な血圧値の低下が観察された[Nakamura, 1995b]。これらの結果から、*L. helveticus* 発酵乳により高血圧の予防および改善効果が期待できることが示唆された。

1-5. 発酵乳の血圧降下作用

乳酸菌の種類と血圧降下作用の関係を調べるために、様々な乳酸菌で作成した発酵乳を SHR に経口投与して、それらの血圧低下作用が比較された。その結果、血圧降下作用の強弱は乳酸菌の菌種により異なり、特に、*L. helveticus* の発酵乳に有意な血圧降下作用が示された[Yamamoto, 1994a]。表 1-5 に代表的な乳酸菌のプロテアーゼ活性や発酵乳の血圧降下作用などを比較した一覧表を示した。*L. helveticus* をはじめとする、血圧降下作用が強い菌株は、いずれも菌体外プロテアーゼ活性が高く、発酵乳中に産生されるペプチド含有量も多かった。ペプチド含有量と ACE 阻害活性には関連性が見られたことから、発酵乳の血圧降下作用は、ACE 阻害作用を持つ

ペプチドが関与している可能性が考えられた。なお、菌体外プロテアーゼ活性が欠損した *L. helveticus* の発酵乳は、血圧降下作用が認められなかったことから、発酵乳の血圧降下作用にはプロテアーゼの作用で乳タンパク質から生成されたペプチドの関与が強く示されていた [Yamamoto, 1994b]。

L. helveticus 発酵乳由来の血圧降下作用を持つ成分の研究の研究は、1990年代に進められた。*L. helveticus* を含むスターターで乳を発酵すると、対数増殖期後期からACE阻害活性が顕著に上昇し、約20時間後に最大値を示した [Nakamura, 1995a] (図1-5)。この発酵乳に含まれるACE阻害作用を持つ成分について、ACE阻害活性を指標に逆相HPLCを用いて精製した結果、2つのピークが単離され、アミノ酸分析およびNMR分析を経て、2種類のペプチド、すなわち Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro が同定された。Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の ACE 阻害活性は IC₅₀ 値 (ACE の酵素活性を 50% 阻害するペプチド濃度) として、それぞれ 9 μ M と 5 μ M と報告された [Nakamura, 1995a]。

L. helveticus 発酵乳および、それと同程度の ACE 阻害活性を示す量の Val-Pro-Pro 又は Ile-Pro-Pro を SHR に単回経口投与した場合について、血圧降下作用が比較された。その結果、両ペプチドは、*L. helveticus* 発酵乳とほぼ同程度の血圧降下作用を示したことから、これらは *L. helveticus* 発酵乳の血圧降下作用に重要な役割を担っていると考えられた [Nakamura, 1995b]。

Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro については、経口投与後の体内動態に関する知見も報告された。SHR に *L. helveticus* 発酵乳を単回投与し、SHR の各組織 (血清、大動脈、肺、肝臓、腎臓、脳) を摘出し、ACE 活性を調べた結果、*L. helveticus* 発酵乳投与群は、生理食塩水を投与した SHR 対照群と正常血圧を示す Wister-Kyoto ラット (WKY) と比べて動脈と肺の ACE 活性が有意に高い値を示した。さらに、HPLC 分析の結果、*L. helveticus* 発酵乳を投与した SHR の動脈抽出物から Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro が検出された [Masuda, 1996]。さらに、Val-Pro-Pro については、小腸上皮様細胞モデルである Caco-2 細胞を用いて腸管吸収性が調べられた。その結果、Val-Pro-Pro ペプチドの一部が Caco-2 細胞を透過し、そのメカニズムは主として拡散であることが報告された [Satake, 2002]。以上の結果、経口摂取した *L. helveticus* 発酵乳に含まれる

Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、小腸から吸収されて動脈に到達し、その組織 ACE 活性を減少させることで血圧降下作用を発揮していることが示唆された。

Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含む *L. helveticus* 発酵乳の有効性については、通院高血圧患者 30 名を対象とした、プラセボ対照 2 群比較試験が実施された。被験者は無作為に 2 群に分けられ、試験群は、*L. helveticus* 発酵乳 95 ml (Val-Pro-Pro 1.5 mg、Ile-Pro-Pro 1.1 mg 含有) を 8 週間毎日飲用し、対照群は、同じ用量のプラセボ飲料を 8 週間飲用した。その結果、試験群の収縮期血圧 (SBP) は、4 週および 8 週後に、それぞれ 9 mmHg および 14 mmHg 有意に低下し、拡張期血圧 (DBP) も同様の傾向を示した [Hata, 1996]。

さらに、高血圧予備軍ともいわれる SBP が 130～139 mmHg を示す正常高値血圧者 106 名に対して 12 週間飲用のプラセボ対照二重盲験試験が実施された。被験者は無作為に試験群とプラセボ群の 2 群に分けて評価された。試験群へは、ドリンクヨーグルトタイプの発酵乳 300 ml (Val-Pro-Pro 2.26 mg、Ile-Pro-Pro 1.48 mg を含有) を、対照群は、同じ用量のプラセボを飲用した。その結果、試験群では、開始時 SBP が 134.1 ± 5.6 mmHg であったが、摂取 2 週間後に 131.0 ± 6.5 mmHg に、そして 12 週間後には 128.0 ± 5.8 mmHg に低下した。試験群の血圧値は、対照群と比較して低い値を示し、群間で有意差が得られた。DBP も同様の傾向を示した [中村, 2004]。

また、フィンランドの研究グループにおいても *L. helveticus* 発酵乳のヒトでの有効性が評価された。39 名の高血圧患者を 2 群に分けて、*L. helveticus* LBK16 株の発酵乳を 21 週間継続飲用し、対照群はプラセボ飲料を同様に飲用した。その結果、発酵乳飲用群の血圧値は、プラセボ飲料摂取群と比較して有意に低下した [Seppo, 2003]。

一方で、乳酸菌が生産する血圧降下作用を発揮する成分には、ペプチド以外にも、アミノ酸の一種である GABA (γ -アミノ酢酸) が知られている。GABA は、乳酸菌が保有するグルタミン酸脱炭酸酵素により、培地中のグルタミン酸が脱炭酸されることで生成される。GABA を生成する乳酸菌種には、*Lactobacillus brevis* や *Lactobacillus plantarum* など、主に植物素材から分離される菌種や、*Lactococcus lactis* のように、タンパク

質分解活性が弱く乳酸生成量も弱い菌種が知られているが、乳の発酵に優れた菌種からの報告は少ない[上野, 2007; 森, 2007; 寺島, 2012]。

GABA 生産菌の発酵乳への利用例としては、*L. lactis* と、*L. casei* の混合培養の発酵乳が知られている[Hayakawa, 2004]。*L. casei* の単菌発酵乳は、血圧降下作用をほとんど示さない[Yamamoto, 1994a]が、自身のもつタンパク質分解系により、乳タンパク質を分解してグルタミン酸を遊離することができる。従って、*L. casei* は、*L. lactis* が GABA を生産するために必要な基質となるグルタミン酸を供給する菌として利用できる。この発酵乳は SHR への経口投与で血圧降下作用を発揮することが知られている[Hayakawa, 2004]。しかし、その他の GABA 生産乳酸菌の発酵乳への応用例はあまり知られていない。

1-6. *L. helveticus* のタンパク質分解系と血圧降下ペプチド

乳酸菌は、乳タンパク質を分解して、アミノ酸を生育のために窒素源として利用するシステムを持っている[Smid, 1991; Thomas, 1981]。そのシステムは、大きく3つのステップに分けられ、最初のステップでは、乳酸菌の菌体表層の外側に存在するプロテアーゼが、乳タンパク質を断片化して発酵乳中にペプチドを蓄積させる[Monnet, 1986; Zevaco, 1988]。乳酸菌の菌体外プロテアーゼは、これまでに7種類がクローニングされて特徴付けがなされた。具体的には、*L. lactis* や *L. paracasei* から PrtP、*L. helveticus* からは PrtH、PrtH2、PrtY、*L. rhamnosus* からは PrtR、*S. thermophilus* からは PrtS、そして *L. bulgaricus* から PrtB が報告された[Kok, 1988; Holck, 1992; Gibert, 1996; Pederson, 1999; Siezen, 1999; Fernandez-Espla, 2000; Yamamoto, 2000; Pastar, 2003]。そのうち、PrtP と PrtH の遺伝子配列には相同性が高いことが報告されている[Pederson, 1999]。

次のステップでは、菌体外プロテアーゼにより生成されたペプチドが、細胞表層に存在するペプチドトランスポーターを介して菌体内に取り込まれる。ペプチドトランスポーターは、これまでに3種類の存在が知られており、比較的長鎖の4~18アミノ酸残基のペプチドは、オリゴペプチドパー

ミアーゼ（OPP）が、2~3アミノ酸残基のペプチドは、H⁺駆動型ジ/トリペプチドトランスポーター（DtpT）が、2~9アミノ酸残基のペプチドはペプチドABCトランスポーター（Dpp）が対応している[Doeven, 2005]。

最後のステップでは、菌体内に取り込まれたペプチドが、細胞質内に存在するペプチダーゼ群によりアミノ酸まで分解される。そして、窒素源として生育に利用されると考えられている。乳酸菌の菌体内ペプチダーゼは、少なくとも16種類あることが報告されている[Christensen, 1999]。

菌体外プロテアーゼの活性は、一般に乳酸球菌より乳酸桿菌のものが強いと報告されている。特に *L. helveticus* は、乳酸桿菌のなかで最も高いプロテアーゼ活性を示すことが報告されている[Yamamoto, 1994a]（表1-5）。乳酸菌の菌体外プロテアーゼ活性に影響を与える要因には、乳酸菌が乳糖を分解して菌体外に産生する乳酸によるpHの低下や、プロテアーゼ関連遺伝子の発現調節などが考えられる。後者については、乳酸球菌の *L. lactis* で研究が行われ、CodYと呼ぶ転写抑制因子による制御システムの存在が報告されている[Guedon, 2001; Petranovic, 2004]。CodYは、菌体内の分岐鎖アミノ酸(Val, Leu, Ile)の濃度を感知して、菌体外プロテアーゼの PrtP 遺伝子、トランスポーターの Opp や DtpT 遺伝子および、各種ペプチダーゼ遺伝子上流にある CodY-box に結合して、下流の遺伝子の転写を抑制して、*L. lactis* のタンパク質分解活性を低下させる[den Hengst, 2005]。一方、乳酸桿菌においては、タンパク質分解活性の制御系に関する報告例はあまり知られていない。一例としては、ペプチドを豊富に含む培地で *L. helveticus* CRL1062株を培養すると、菌体外プロテアーゼ（PrtH）の活性が低下することが報告され、その理由としては、アミノ酸の Pro や Leu が、PrtH 活性の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている[Hebert, 2000]。このように、乳酸桿菌においても、菌体外プロテアーゼの活性を調節するメカニズムの存在が示唆されているために、今後、関連する研究が進展すれば、これまで不明であった、菌種や菌株の違いによるプロテアーゼ活性の強弱について何らかの知見が得られると期待される。

ACE 阻害ペプチド Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の乳酸菌発酵による生成メカニズムについては、*L. helveticus* CP790 株を用いて研究が行われた。*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼについては単離精製され、その性質と、カゼインタンパク質に対する主な切断部位が報告され

た。しかし、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、その切断部位からは見出されなかった [Yamamoto, 1993]。その後の研究で、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、*L. helveticus* の菌体外プロテアーゼによって β カゼインから生成された 28 から 29 アミノ酸からなる比較的長いペプチドが前駆ペプチドとして、菌体内に取り込まれた後、さらに複数のペプチダーゼによる分解を受けて生成され则认为られている [Yamamoto, 1993; Ueno, 2004]。

L. helveticus のプロテアーゼは、分子量約 45 kDa のタイプのものと、分子量約 180 kDa のタイプに分けられることが報告されており [Yamamoto, 1998]、それぞれカゼイン配列の切断部位が異なることが判っている [Ono, 1997]。前者のプロテアーゼは、*L. helveticus* CP790 株から、後者は、*L. helveticus* CP53 株から見出されたが、これらプロテアーゼの違いと Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の生産性については、大きな違いは認められていない [Yamamoto, 1998; Ono, 1997]。

乳を *L. helveticus* で発酵させることで Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を生成させるプロセスは、これらのペプチドが、乳酸発酵の進行と共に *L. helveticus* が産生するタンパク質分解酵素により生じるため、発酵条件によって、ペプチドの生成量は変動しやすく、一定の含有量で安定的に得ることが困難である、従って本生成プロセスには、産業応用上の課題があると考えられる。また、*L. helveticus* は、他の種類の乳酸菌よりも乳酸生成力が高いために、得られた発酵乳の酸味が非常に強く、摂取時には、加糖や希釈など風味調整が必要となる。そこで、乳酸発酵を伴わない酵素分解によるペプチド素材の開発や、発酵条件の検討により、酸味を抑えた発酵乳開発を目指すなど、より風味が良くて摂取しやすい形態の素材開発を目的として、*L. helveticus* のタンパク質分解系の研究が進められた [Yamamoto, 1993]。

それらの研究を進めるなかで、*L. helveticus* から単離した菌体外プロテアーゼでカゼインを直接分解することで得られたペプチド混合物は、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含まないのにも関わらず、高血圧モデルラットである SHR へ投与すると、顕著な血圧降下作用があることが明らかになった。しかし、その有効成分までは解明されていない [Yamamoto, 1994b]。さらに、発酵時間を 10 時間程度で停止させて、酸味を抑えた状

態の *L. helveticus* 発酵乳は、ACE 阻害活性が低く、Val-Pro-Pro や Ile-Pro-Pro を含まないのにも関わらず、SHR への経口投与で顕著な血圧降下作用を示した[Yamamoto, 1994b]。この発酵乳に含まれる有効成分も詳細は判っていない。従って、*L. helveticus* は、Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro 以外にも、血圧降下ペプチドを生成している可能性が強く示唆されたため、それらの活性本体となる有効成分を解明すれば、より工業的に安定な血圧降下ペプチド生産方法の開発や、従来よりも酸味の影響の少ない嗜好性に優れた血圧降下素材開発につながる可能性が示されていた。

1-7. *L. helveticus* 発酵乳の安全性

食品の安全性は、長年の食経験から担保されている。しかし、特定保健用食品や栄養機能食品のように、何らかの健康効果を期待して摂取する食品の場合には、有効成分の量や食品の加工度から考えて、十分な食経験が無いか、または乏しいと判断される場合には、ヒトへの安全性評価に先立って *in vitro* 試験及び、動物を用いた *in vivo* 試験を実施する必要がある[内閣府 食品安全委員会, 2004, 2007]。

発酵乳の原点は、乳を木桶や皮袋の容器に入れて保存した際に、それら容器に付着していた乳酸菌の自然発酵で生じた物の利用だと考えられている。この発酵乳を人類による利用の歴史から考察すると、利用の始まりは紀元前 5000 年頃と大変古く[森, 2007]、その点からは食経験が豊富な食品だと考えられる。*L. helveticus* 発酵乳の発酵乳については、日本国内において 90 年以上の摂取経験がある。それに加え、*L. helveticus* 発酵乳の血圧値や、循環器機能に与える影響を確認することを中心として、動物やヒトへの飲用試験が行われ、科学的なデータが取得された。

動物への評価としては、正常血圧を示す Wistar-Kyoto ラット(WKY)へ、体重 1 kg あたり 25 ml の *L. helveticus* 発酵乳を単回経口投与し、血圧への影響が調べられた。その結果、WKY ラットの血圧には大きな変化を与えなかった[Nakamura, 1995b]。さらに、SHR に 7 週齢より 23 週齢まで *L. helveticus* 発酵乳を添加した飼料を自由摂取させた試験では、

L. helveticus 発酵乳群と対照(基礎飼料)群との間で飼料摂取量、体重変化に差は無かった。そして、*L. helveticus* 発酵乳添加食群は、対照群に対して有意に低めの血圧値を示したが、それらの臓器重量、血液成分の測定結果は、対照群との差は無かった[Nakamura, 1996]。23 週令の SHR および WKY ラットの腹部大動脈、肺、腎臓、心臓、脳を摘出し、各部位の ACE 活性を比較すると、SHR では WKY ラットに比べ腹部大動脈 ACE 活性が 10 倍亢進していた。*L. helveticus* 発酵乳発酵乳を経口投与すると、SHR では、腹部大動脈 ACE 活性は有意に減少したが、他の部位では変化しなかった。また、WKY ラットに *L. helveticus* 発酵乳を投与し同様に ACE 活性を測定したが、いずれの部位にも変化はなかった。SHR を用いた試験において、*L. helveticus* 発酵乳を投与した SHR の腹部大動脈の熱処理可溶化画分からは、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro のペプチドが検出された。一方、他の部位または WKY ラットのいずれの部位からも、これらのペプチドは検出されなかった[Masuda, 1996]。

ヒトへの安全性評価に対しては、健康な成人ボランティア 60 名を対象として、*L. helveticus* 発酵乳を一度に大量摂取したときの胃腸症状への影響が調べられた。飲用量としては、体重 60 kg 当たり *L. helveticus* 発酵乳 100 ml を基準とし、その 1~5 倍量の 5 段階の用量を、また対照として未発酵乳を用いて同様に 5 段階の用量が設定された。その結果、両群の胃腸症状に有意な差はなく、検出した胃腸症状も一過性で、治療を要するものではなかった。さらに、*L. helveticus* 発酵乳群には下痢も認めなかった[中島, 1996]。正常血圧者 26 名の健康な成人ボランティアに対しても、*L. helveticus* 発酵乳の飲用による、血圧、心拍数、血液成分、自覚症状に与える影響が調べられた。被験者は、無作為に 2 群に振り分けられ、一方には、*L. helveticus* 発酵乳 95 ml(Val-Pro-Pro 1.5 mg、Ile-Pro-Pro 1.1 mg 含有)を毎日 8 週間飲用させた。もう一方にはプラセボ飲料を同様に飲用させた。その結果、両群ともに、血圧、心拍数、体重、血液成分を含め、測定したいずれの指標にも大きな変化はなかった[板倉, 2001]。

以上のように、*L. helveticus* 発酵乳そのものは、安全性も高く、血圧降下作用をはじめとする様々な健康機能性を持つ可能性がある有望素材であることが示されていた。一方で、この *L. helveticus* 発酵乳を粉末化

して、発酵成分が濃縮された状態の素材については、その安全性を科学的に説明するために必要な知見は、十分に得られていない。

1-8. *L. helveticus* 発酵乳の食品応用に関する課題

発酵乳は、乳酸菌のプロテアーゼの作用で乳タンパク質が分解されて生成された様々なペプチドを含有しており、風味良好なペプチド素材として有望である。なかでも、*L. helveticus* は、他の乳酸菌に比べてタンパク質分解活性が強いために、多くのペプチドを産生する[Yamamoto, 1994a]。これまでも、*L. helveticus* を含むスターターを用いて 37℃で 24 時間発酵させた発酵乳から、ACE の阻害活性をもつペプチドである Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro が見出されてきた[Nakamura, 1995a]。この発酵乳は、発酵で生じた乳酸が強い酸味を呈するために、直接飲用が困難なことが課題であった。一方で、発酵を 10 時間で止めて酸味を抑えた *L. helveticus* 発酵乳や、*L. helveticus* から精製したプロテアーゼでカゼインを直接分解したペプチドにも、自然発症高血圧ラット(SHR)への経口投与で血圧降下作用が示されたため、風味良好な食品開発の可能性が示されていた[Yamamoto, 1993, 1994b]。しかし、いずれの素材も、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含有しておらず、血圧降下作用を示す活性本体は明らかになっていない。

さらに、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含んだ酸味の強い *L. helveticus* 発酵乳についても、乳酸を低減させた粉末化素材が開発された。これによって、*L. helveticus* が生成する Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro をはじめとする機能性成分が、酸味の影響を軽減した形で風味良好な食品開発に利用できるようになった。しかし、原料発酵乳由来の様々な成分が濃縮されたため、過剰摂取を想定した安全性をあらたに考察する必要性が生じた。

1-9. 本論文の目的と構成

本研究では、食品に利用可能な風味良好な血圧降下ペプチド素材の開発に向けて、*L. helveticus* が生成する Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro 以外の血圧降下ペプチドの存在と、その作用メカニズムを明らかにして、産業応用への可能性を探る基礎的知見を得ることを第一の目的とした。次に、*L. helveticus* 発酵乳の乳酸低減粉末の実用化に向けた一助とすべく、本粉末素材について、動物細胞および動物を用いて安全性に関する基礎知見を得ることを第二の目的とした。

すなわち、第 1 章では、国民生活における高血圧症の問題や、それに食品で対処することの意義や科学的根拠について整理し、特に、発酵乳由来の血圧降下ペプチドの有望性と課題についてレビューした。第 2 章では、風味良好な血圧降下ペプチド素材の開発に向けて、乳酸菌 *L. helveticus* CP790 株から単離精製した菌体外プロテアーゼによる乳カゼイン分解物から血圧降下作用を持つ有効ペプチドの単離・同定を行なった。SHR に対する血圧降下作用を指標として、血圧降下作用を示す主要ペプチドを検索した。第 3 章では、前章で見出した血圧降下ペプチドの作用メカニズムを研究した。そこでは、ペプチドを経口投与した後の消化過程での挙動から作用メカニズムを推定すべく、人工消化試験を実施した。さらに血圧降下作用を示す活性本体についても研究した。第 4 章では、酸味を抑えたヨーグルトタイプの風味良好な血圧降下素材開発に向けた研究を行った。乳酸菌株は、*L. helveticus* CP790 株から派生した酸生成力の弱い変異株 *L. helveticus* CPN4 株を用い、発酵は、一般的なヨーグルトに近い pH 4 付近で停止させた。この酸味を抑えた発酵乳に含まれる血圧降下作用を持つ成分を探索した。第 5 章では、*L. helveticus* 発酵乳全体の安全性について、科学的根拠を強化するために、当該ホエー成分を乳酸低減後に濃縮粉末化した素材を用いて、動物細胞や動物を用いた安全性評価を実施した。

以上、これらの研究を通して、血圧降下作用をはじめとする、風味良好な機能性食品開発に向けた研究および、実用化のための技術開発に必要な基礎的知見を得ることを目指した。

表 1-1『高血圧治療ガイドライン 2009』における成人の血圧値の分類

(mmHg)			
分類	収縮期血圧		拡張期血圧
至適血圧	<120	かつ	<80
正常血圧	120-129	かつ	80-84
正常高値血圧	130-139	または	85-89
I 度高血圧	140-159	または	90-99
II 度高血圧	160-179	または	100-109
III 度高血圧	≥ 180	または	≥ 110
(孤立性)収縮期高血圧	≥ 140	かつ	<90

[日本高血圧学会, 2009]

表 1-2 収縮期血圧が 2mmHg 低下することで予測される疾病の年間死亡者数と年間罹患者数の予測

(人)			
	脳卒中	虚血性心疾患	循環器疾患
死亡者の減少	9,127	3,944	21,055
罹患者の減少	19,757	5,367	-

[健康日本 21, 2000]

表 1-3 乳タンパク質から見出された主な機能性ペプチド

機能	配列（アミノ酸1文字表記）	由来	出展
オピオイドアゴニスト	RYLGYL	α_{S1} カゼイン	Loukas 1983
オピオイドアンタゴニスト	YPSYGLN	κ カゼイン	Xu 1998
免疫調節	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	β カゼイン	Minkiewicz 2000
抗凝固作用	MAIPPKKNQDDK	κ カゼイン	Fiat 1989
抗菌作用	YQEPVLGPVRGPFPIIV	β カゼイン	Xu 1998
カルシウム吸収促進 (ホスホペプチド)	RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	β カゼイン	Smacchi 2000

表 1-4 発酵乳・乳酸菌の栄養・生理効果についての主な研究

機能領域	生理効果		乳酸菌の要因
●栄養増強	・栄養価の改善	蛋白の予備消化	代謝活性
		ビタミン生成	蛋白分解活性
	・吸収促進	ミネラル吸収促進	ビタミン生成能
		乳糖分解	乳酸生成
●寿命延長	・乳糖不耐改善		乳糖分解酵素
●感染防御	・整腸効果 腸内フローラの改善 有害菌の抑制	抗菌物質	抗菌物質生産能
		菌体と腸管との親和性	
			菌体構成成分
●制癌	・有害代謝活性の抑制 ・抗変異原性 ・免疫賦活	発酵乳中のオリゴ糖	多糖類 菌体壁成分
		変異原物質の吸着	細胞表面構造
		マクロファージ活性化	
●抗アレルギー	・I型アレルギー改善	Th1/Th2バランス改善	
●抗循環器病	・血中コレステロール低減	コレステロール	
		合成阻害	
		吸収阻害	
		排泄促進	
	・血圧降下	ACE阻害物質生成 プロスタグランジン生成	

[高野, 1996]より一部改編

表 1-5 各種乳酸菌発酵乳のACE阻害活性と血圧降下作用

Strain	Peptide concentration ¹ (%)	Proteinase activity ² (U / ml)	ACE inhibitory activity ³ (U / ml)	SBP ⁴ (-ΔmmHg)	
Control(milk)	0.00	-	0	-5.0 ±	7.3
(Lactobacilli)					
<i>L. helveticus</i> CP790	0.19	230	58	-27.4 ±	13.3 * *
<i>L. helveticus</i> CP611	0.25	367	70	-20.0 ±	9.6 * *
<i>L. helveticus</i> CP615	0.18	420	51	-23.0 ±	13.4 * *
<i>L. helveticus</i> JCM1006	0.15	182	26	-15.2 ±	9.3 *
<i>L. helveticus</i> JCM1120	0.10	112	34	-6.5 ±	10.8
<i>L. helveticus</i> JCM1004	0.21	186	48	-29.3 ±	13.6 * *
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CP973	0.19	105	22	-0.8 ±	8.2
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM1002	0.11	124	28	-4.5 ±	4.0
<i>L. casei</i> CP680	0.01	35	3	-0.2 ±	6.6
<i>L. casei</i> JCM1134	0.00	28	9	-7.0 ±	11.2
<i>L. casei</i> JCM1132	0.09	25	18	-9.6 ±	7.2
<i>L. acidophilus</i> JCM1132	0.00	28	8	-8.7 ±	7.8
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> JCM1105	0.08	18	16	-3.3 ±	3.5
(streptococci)					
<i>S. thermophilus</i> CP1007	0.02	25	3	-2.4 ±	8.1
(Lactococci)					
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CP684	0.00	35	4	-7.3 ±	10.5
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CP312	0.02	18	4	-5.8 ±	13.9

[Yamamoto, 1994] より一部改変

¹ Peptide concentration of fermented milks were measured by the OPA method [Charch 1983] using typtic digest as a standard peptide.² Proteinase activity of various bacteria were measured by Twinnging's method [Twining 1984].³ The ACEinhibitory activity of each whey fraction was evaluated at the concentration that inhibited 50% of the ACE activity by serial dilution. One unit of ACE inhibitory activity was defined as the amount of enzyme that inhibit the 50% of ACE activity.⁴ Systolic blood pressureSignificant difference from control: Mean±SD (n=5) **p* < 0.05, ***p* < 0.01

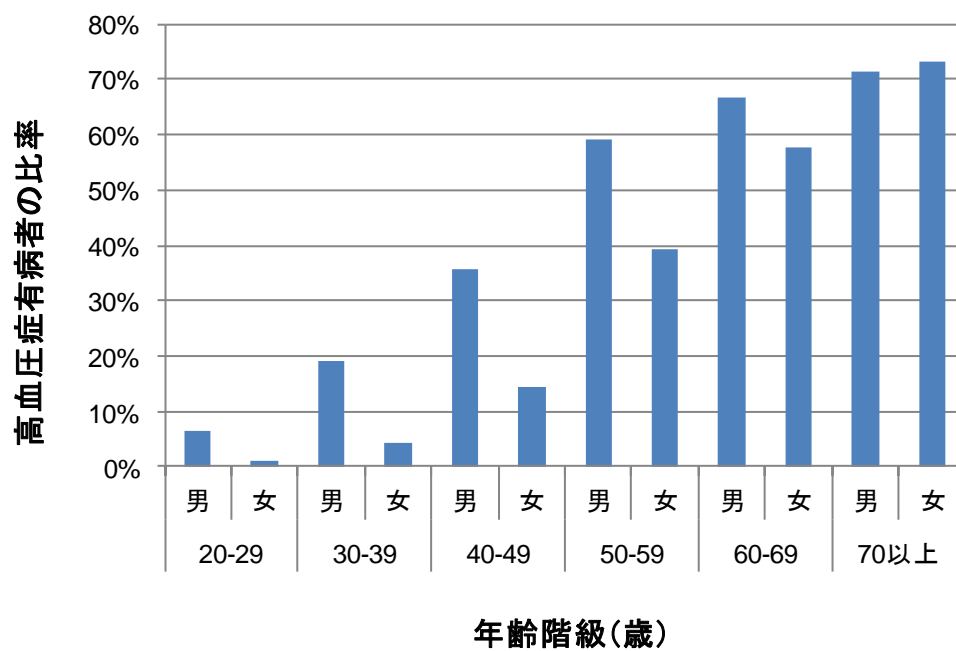


図 1-1 高血圧症有病者の状況(平成 18 年国民健康・栄養調査)

[厚生労働省, 2008]

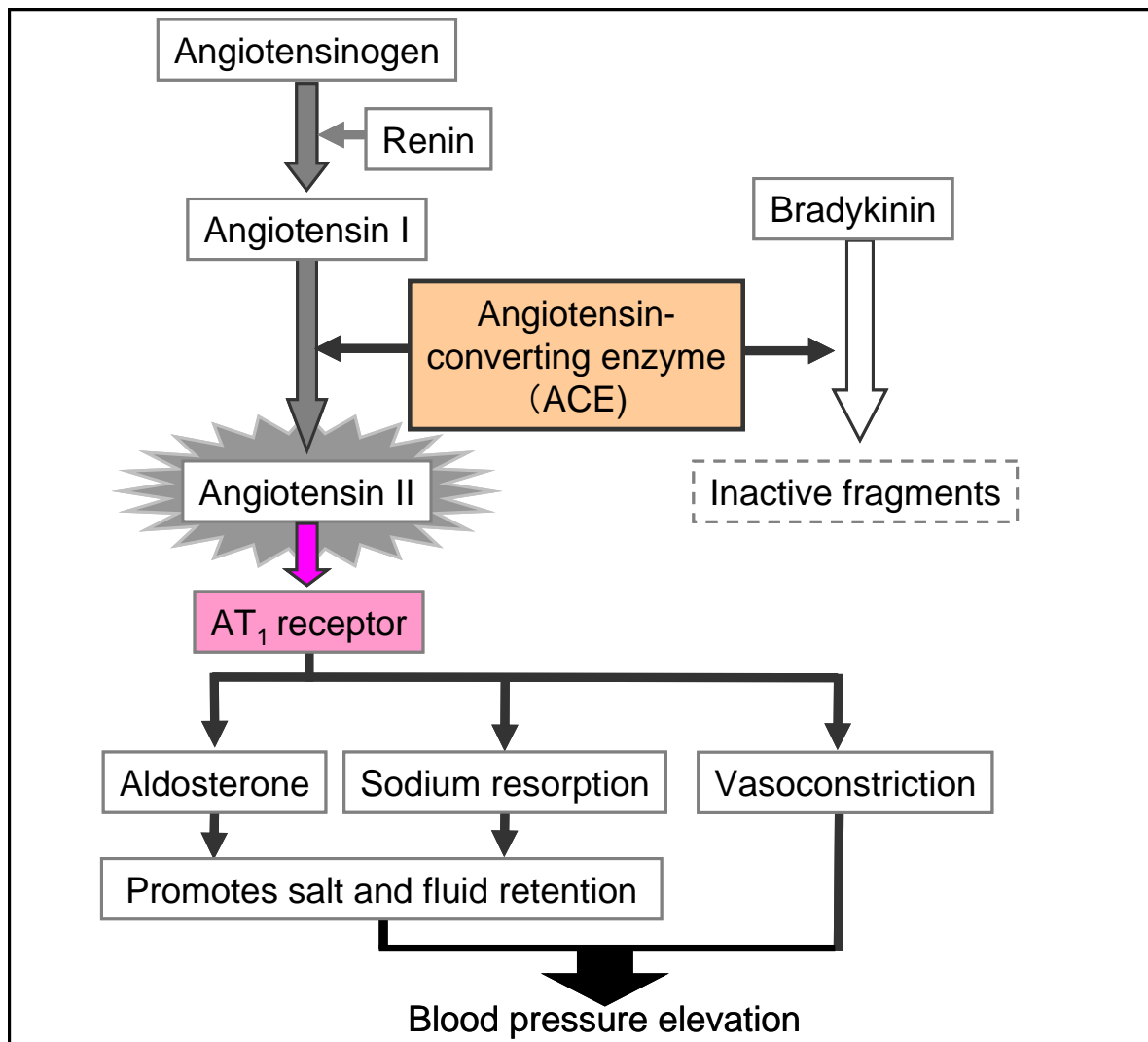


図 1-2 レニン-アンジオテンシン系を介した血圧上昇メカニズム

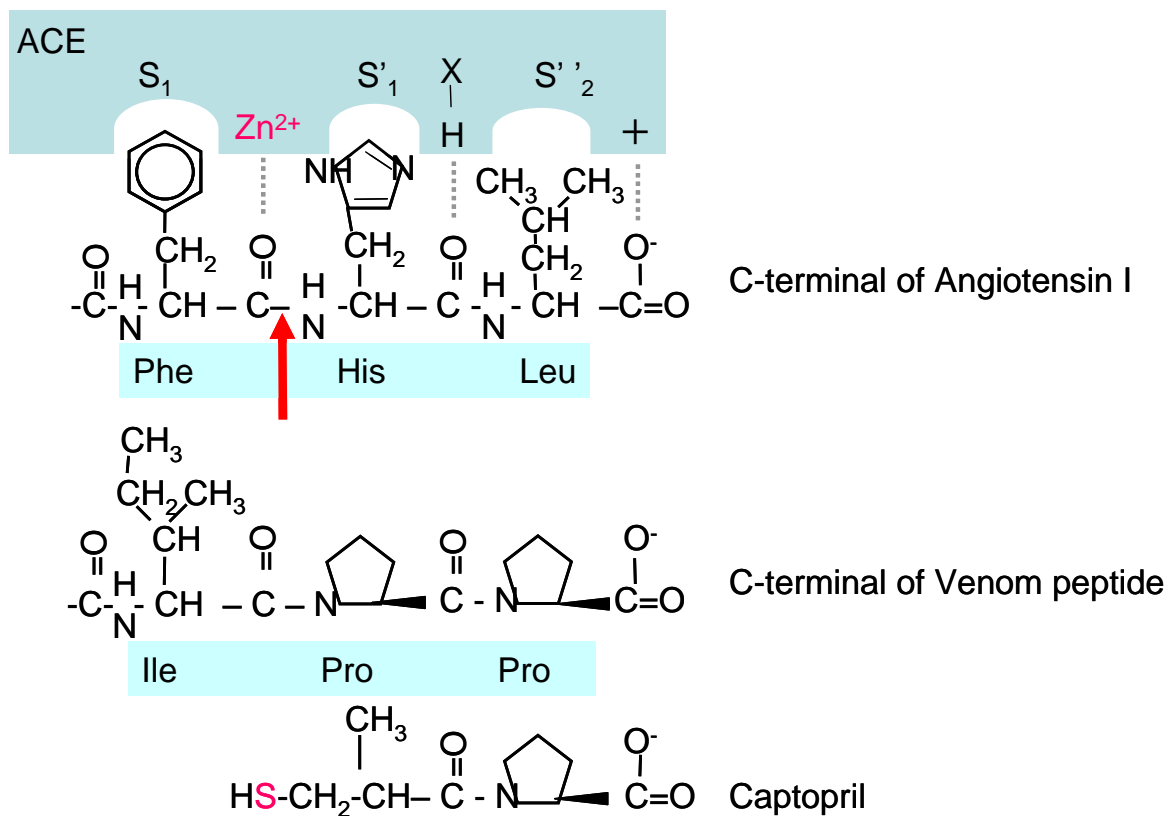


図 1-3 アンジオテンシン変換酵素（ACE）と基質、阻害剤の結合様式に関する模式図

[Ondetti, 1977; Cheung, 1980]を参考に作製した。矢印（↑）は切断部位

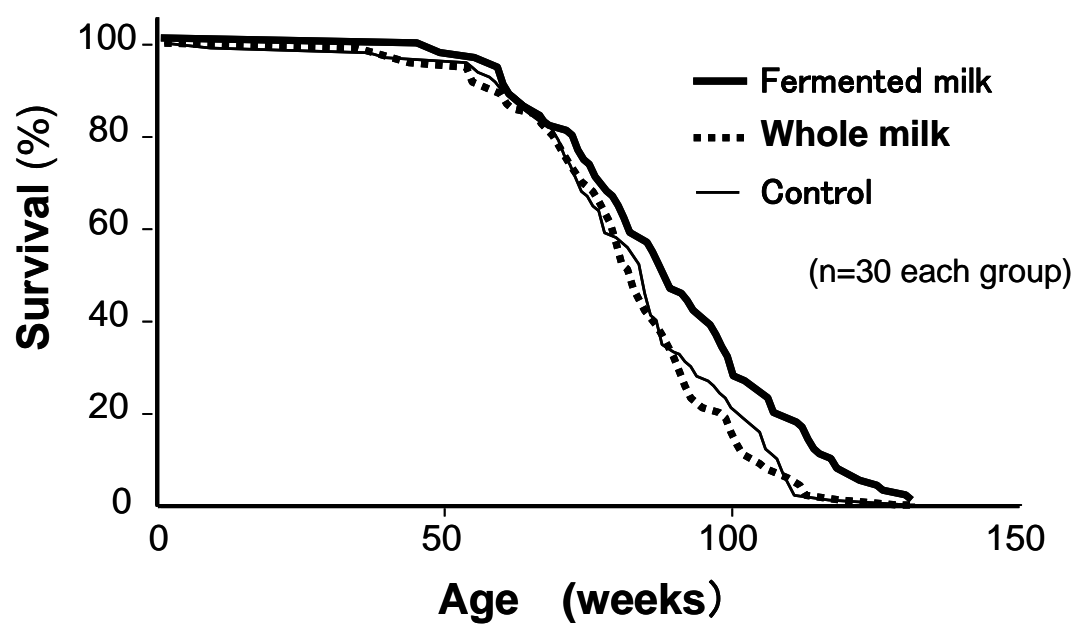


図 1-4 ICR マウスの生残率の経時変化

[新井, 1980]より一部改変

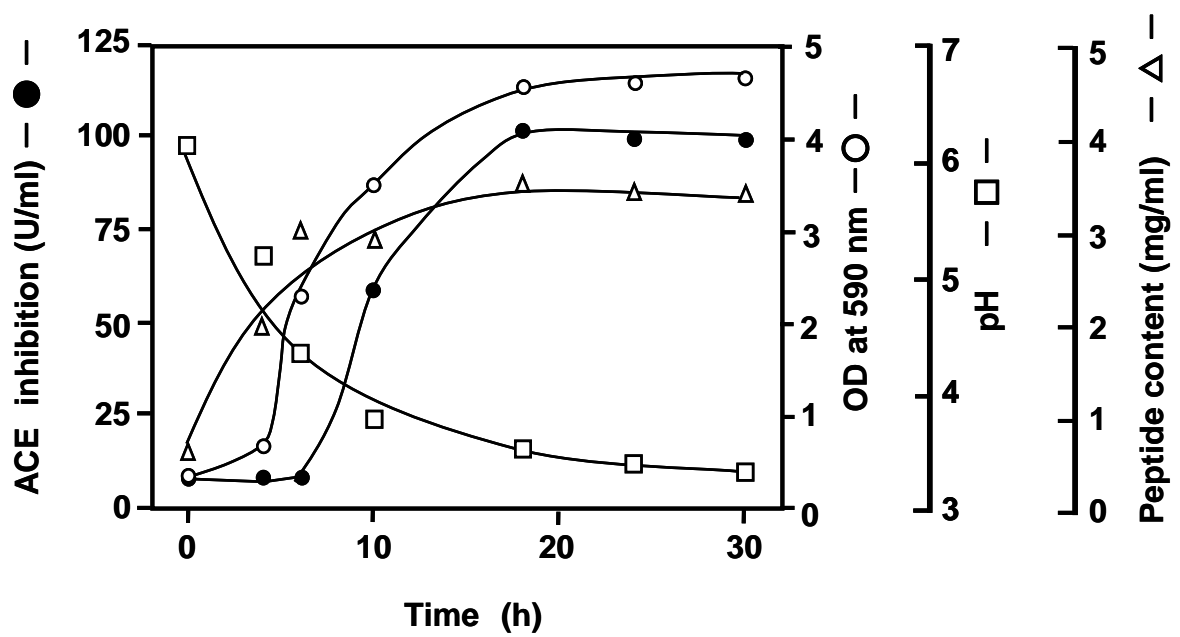


図 1-5 *L. helveticus* の発酵における各種パラメータの経過時変化

[Nakamura, 1995a]

1-10. 参考文献

- Cheung, HS., Wang FL., Ondetti, MA., Sabo, EF., Cushman, DW.
Binding of Peptide. Substrates and inhibitors of
angiotensin-converting. enzyme, J. Biol. Chem. 1980; 255: 401-405.
- Christensen, JE., Dudley, EG., Pederson, JA., Steele, JL. Peptidases
and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie Van
Leeuwenhoek 1999; 76: 217-246.
- Cushman, DW., Cheung, HS. Spectrophotometric assay and properties
of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem.
Pharmacol. 1971; 20: 1637-1648.
- den Hengst, CD., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van
Sinderen, D., Kuipers, OP., Kok, J. Probing direct interactions
between CodY and the oppD promoter of *Lactococcus lactis*. J.
Bacteriol. 2005; 187: 512-521.
- Doeven, MK., Kok, J., Poolman, B. Specificity and selectivity
determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other
microorganisms. Mol. Microbiol. 2005; 57: 640-649.
- Erdoš EG. Angiotensin-Converting enzyme. Circulation Research
1975; 36: 247-255.
- Fernandez-Espla, MD., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. *Streptococcus*
thermophilus cell wall-anchored proteinase: release, purification,
and biochemical and genetic characterization. Appl. Environ.
Microbiol. 2000; 66: 4772-4778.
- Fiat, AM., Jolles, P. Caseins of various origins and biologically active
casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological
aspects. Molecular and Cellular Biochemistry. 1989; 87: 5-30.
- Fujita, H., Yoshikawa, M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory
peptide derived from fish protein, Immunopharmacology, 1999; 44:
123-127.
- Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B., Portalier, R., Germond, GJ., Lapierre,
L., Mollet, B. A new cell surface proteinase: sequencing and

- analysis of the prtB gene from *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus*. J. Bacteriol. 1996; 178: 3059–3065.
- Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, SD., Renault, P., Delorme, C.
Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. 2001; 40: 1227-1239.
- Habibi-Najafi, MB., Lee, BH. Bitterness in cheese. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1996; 36: 397–411.
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. Am. J. Clin. Nutr. 1996; 64: 767–771.
- Hayakawa, K., Kimura M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., Yamoria, Y. Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. British Journal of Nutrition 2004; 92 : 411-417.
- Hebert, EM., Raya, RR., De Giori, GS. Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 5316-5321.
- Holck, A., Naes, H. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. J. Gen. Microbiol. 1992; 138: 1353-1364.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U., Takemoto, S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. Comp. Biochem. Physiol. 1990; 96: 367-371.
- Kok, J., Leenhouts, KJ., Haandrikman, AJ., Ledebøer, AM., Venema, G. Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54:

- 231-238.
- Li, GH., Qu, MR., Wan, JZ., You, JM. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2007;16 Suppl 1: 275-80.
- Loukas, S., Varoucha, D., Zioudrou, C., Streaty, RA., Klee, WA. Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochemistry.* 1983; 22: 4567-4573.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Suzuki, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α s1-casein. *Agric. Biol. Chem.* 1987a; 51: 2557-2561.
- Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T., Tanaka, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.* 1989; 53: 1077-1081.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N., Suzuki, H. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.* 1987b; 51: 1581-1586.
- Maruyama, S., Nakagome, K., Tomizuka, N., Suzuki, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. 11. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 1985; 49: 1405-1409.
- Marczak, ED., Usui, H., Fujita, H., Yang, Y., Yokoo, M., Lipkowski, AW., Yoshikawa, M. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 2003; 24: 791-798.
- Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 1996; 126: 3063-3068.

- Matsui, T. Kawasaki, T. Antihypertensive Effect of bioactive peptides derived from food proteins -Development of antihypertensive food with bioactive sardine muscle peptide (Val-Tyr)- [In Japanese] . J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 2000; 53: 77-85.
- Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K., Shimizu. T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bonito bowels autolysate. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993; 57: 695-697.
- Metchnikoff, E. The prolongation of life: Optimistic Studies. CP Putnam's Sons. New York. 1908 (メチニコフ E. 平野威馬雄 訳 長寿の研究-楽観論者のエッセイ. 幸書房 2006.).
- Minkiewicz, P., Slangen, C.J., Dziuba, J., Visser, S., Mioduszevska, H. Identification of peptides obtained via hydrolysis of bovine casein by chymosin using HPLC and mass spectrometer. Milchwissenschaft. 2000; 55: 14-17.
- Monnet, V., Bars, Dle., Gripon, C. Specificity of a cell wall proeinase from *Streptococcus lactis* NCD0763 towards bovine β -casein. FEMS Microbiol. Lett 1986; 36: 127-131.
- Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 1996; 60: 488-489.
- Nakamura, Y., Yamamoto. N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. J. Dairy Sci. 1995a; 78: 777-783.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. J. Dairy. Sci. 1995b; 78: 1253-1257.

- Ondetti, MA., Rubin, B., Cushman, DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196: 441-444.
- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., Jovanovic, G. Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 5802-5811.
- Peach M. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action *Physiol. Rev.* 1977; 57: 313-370.
- Pederson, JA., Mileski, GJ., Weimer, BC., Steele, JL. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 4592-4597.
- Petranovic, D., Guedon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D., Renault, P. Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol.* 2004; 53: 613-62.
- Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, Y., Arai, S., Shimizu, M. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2002; 66: 378-384.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77: 326-330.
- Skaggs, LT., Kahn JE., Shum way, NP. The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 1956; 103: 295-299.
- Smache, E., Gobbets, M. Bioactive peptides in dairy products: Synthesis and interaction with proteolysis enzymes. *Food Microbiology* 2000; 17: 129-141.

- Smid, E.J., Poolman, B., Konings, W.N. Casein utilization by lactococci. Appli. Environ. Microbiol. 1991; 57: 2447-2452.
- Thomas, T.D., Mills O.E. Proteolytic enzymes of starter bacteria Neth. Milk Dairy J. 1981; 35: 255-273.
- Uehara, Y. Experimental Model for Spontaneously Hypertension Rat (SHR) [In Japanese] . Nephrology Frontier 2009; 8: 69-71.
- Ueno, K., Mizuno, S., Yamamoto, N. Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. Lett Appl Microbiol. 2004; 39: 313-318.
- WHO News release, World Health Day 2013: measure your blood pressure, reduce your risk
http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/world_health_day_20130403/en/ (accessed 11.4.2013)
- Xu, R.J. Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. Food Reviews International 1998; 14: 1-17.
- Yokoyama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. Peptide inhibitors for angiogenesis I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992; 56: 1541-1545.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Biochem. 1993; 114: 740-745.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano T. Antihypertensive effect of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 1994a; 58: 776-778.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Dairy Sci. 1994b; 77:917-922.
- Yamamoto, N., Shinoda, T., Takano, T. Molecular cloning and sequence analysis of a gene encoding an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000; 64: 1217-1222.

Zevaco, C., Gripon, GC. Properties and specificity of a cell wall proteinase from *Lactobacillus helveticus*. Lait 1988; 68: 393-408.

荒井幸一郎, 室田一也, 早川邦彦, 片岡元行, 光岡知足 殺菌発酵乳投与マウスの寿命, 腸内菌叢におよぼす影響について. 栄養と食糧 1980; 33: 219-223.

板倉弘重, 池本真二, 寺田幸代, 近藤和雄 酸乳の高血圧者および正常高血圧者に対する影響. 日本臨床栄養学会雑誌 2001; 23: 26-31.

上野義栄, 平賀和三, 森義治, 小田耕平 漬物から γ -アミノ酪酸(GABA)高生産性乳酸菌の分離とその応用. 生物工学会誌 2007; 85: 109-114.

勝谷友宏, 日垣實男, 荻原俊夫 高血圧のモデル動物 分子心血管病. 2000; 1: 89-94.

久住朝子, 前野正文 乳酸菌と酵母の共生・共存によって生み出されるおいしさ 日本乳酸菌学会誌 2013; 24: 101.

厚生労働省 平成 23 年患者調査. 2012a.
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/11/>
 (accessed 11.4.2013)

厚生労働省 平成 22 年度 国民医療費の概況. 2012b.
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/10/>
 (accessed 11.4.2013)

厚生労働省 平成 18 年 国民健康・栄養調査報告. 2009.
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyohi08/01.html>
 (accessed 11.4.2013)

健康日本 21 企画検討会 健康日本 21 計画策定検討会 21 世紀における国民健康づくり運動(健康日本 21)について 報告書. 2000.
http://www1.mhlw.go.jp/topics/kenko21_11/pdf/all.pdf
 (accessed 11.4.2013)

高野俊明, 中村康則, 横倉輝男 阿部文明 乳酸菌の科学と技術 乳酸菌研究集談会編 1996; 311-341.

寺島晃也, 多田耕太郎, 加藤一郎, 中川義久, 平野寛, 鈴木敏郎 富山県地域資源からの γ -アミノ酪酸(GABA)生産乳酸菌の分離. Microbiol. Cult. Coll, 2012; 28: 11-18.

内閣府 食品安全委員会 HP 特定保健用食品の安全性評価に関する基本的考え方 2004.

<http://www.fsc.go.jp/senmon/sinkaihatu/index.html>
(accessed 11.4.2013)

内閣府 食品安全委員会 HP 特定保健用食品個別製品ごとの安全性評価等の考え方について 2007.

<http://www.fsc.go.jp/senmon/sinkaihatu/index.html>
(accessed 11.4.2013)

中島久実子, 中村康則, 高野俊明, 秦葭 哉 酸乳経口摂取と消化器症状について - 消化管に対する最大無作用量と 50% 効果量の検討 -. *Progress in Medicine* 1996; 16: 917-921.

中村康則, 梶本修身, 金子京子, 相原浩太郎, 水谷潤, 池田なぎさ, 西村明, 梶本佳孝 「ラクトトリペプチド(VPP,IPP)」を含有する液状ヨーグルトの長期摂取が正常高値血圧に及ぼす影響. *健康・栄養食品研究* 2004; 7: 123-137.

日本高血圧学会 高血圧治療ガイドライン作成委員会 高血圧治療ガイドライン 2009.

森敦 発酵乳(ヨーグルト)などに用いられる乳酸菌の機能 乳酸菌の保健機能と応用 上野川修一監修. シーエムシー出版 2007; 147-156.

森久子, 渡部恭子 磯野義員茶抽出物中で γ -アミノ酪酸を生成する乳酸菌 *Lactobacillus brevis* mh4219 の分離とそれを用いた発酵茶飲料のストレス軽減効果. *生物工学会誌* 2007; 85: 521-526.

吉川正明 食品の生体調節機能と *in vitro* バイオアッセイ. *化学と生物* 1993; 31: 342-346.

和田光一, 荒井幸一郎, 高野俊明, 室田一也, 早川邦彦, 水谷武夫, 光岡知足 腸内フローラと成人病 光岡知足編. 1985; 175-196.

第2章 カゼイン分解物からの血圧降下ペプチドの単離同定

2-1. 緒言

血圧調節メカニズムのひとつにレニン-アンジオテンシン系があり、血圧上昇には、アンジオテンシン変換酵素(ACE)と呼ばれるペプチダーゼが関与している。1970年代初頭、蛇毒由来のペプチドが、ACEの酵素活性を阻害し、生体内でも阻害作用を発揮して血圧低下を生じることが判った[Ondetti, 1977]。この蛇毒由来のペプチドは、C末端にPro残基を持ち、それがACE阻害活性に寄与していたことから、医薬品開発への応用はもちろん、様々な食品素材から、ACE活性を阻害するペプチドの探索が活発化した。

ACE阻害活性をもつペプチドは、乳タンパク質[Karaki, 1990; Maruyama, 1985, 1987a, 1987b]、トウモロコシ[Maruyama, 1989]、鰹節[Matsumura, 1993; Yokoyama, 1992]など様々な食品タンパク質から見出されている。特に、乳由来のACE阻害ペプチドが数多く見出されていることから、乳タンパク質は、ACE阻害機能性ペプチドの配列を内在する可能性が高い素材と言える。しかし、ACE阻害作用を持つペプチドのなかには、*in vitro*試験で見かけ上はACE阻害活性を示すが、*in vivo*では血圧降下作用を示さないものが報告されている[Fujita, 1999]。その理由は、消化酵素の分解によるACE阻害活性の消失や、腸管からの吸収性が低いことなどが考えられている。従って、血圧降下作用を発揮するACE阻害ペプチドを見出すためには、*in vitro*試験だけではなく*in vivo*での評価も実施する必要がある。

*L. helveticus*は、乳酸桿菌のなかで、最も高いプロテアーゼ活性を示すことが報告されている[Yamamoto, 1994a]。*L. helveticus* CP790株の菌体外プロテアーゼは単離精製され、アミノ酸配列や遺伝子配列が決定されるとともに、その性質や、カゼインタンパク質に対する主な切断部位が調べられた[Yamamoto, 1993]。一方で、*L. helveticus* CP790株から単離した菌体外プロテアーゼを用いてカゼインを分解すると、様々なペプチドが遊離したペプチド混合物が得られる。このペプチド混合物を

高血圧モデルラットである SHR へ経口投与すると、顕著な血圧降下作用があることが示された[Yamamoto, 1994b]。しかし、これまでに報告されてきた Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含まないことが判った。そこで、本ペプチド混合物を分析して、比較的 ACE 阻害活性が高かったペプチドを選定して、化学合成後に SHR に経口投与されたが、血圧降下作用は確認できていない[Yamamoto, 1994b]。従って、*L. helveticus*CP790 株は、既知の Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro 以外にも、血圧降下ペプチドを生成している可能性が強く示唆され、そのペプチドは、ACE 阻害活性に依存しない可能性が示唆された。

そこで、本研究では、乳酸菌 *L. helveticus* CP790 株から単離精製した菌体外プロテアーゼによる乳カゼイン分解物から血圧降下作用を持つ有効成分の同定を行った。その結果、ACE 阻害活性は弱いですが、SHR への経口投与により血圧降下作用を示すペプチドである Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を単離することができた。

2-2. 材料と実験方法

2-2-1. 試薬

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu)、ACE はシグマ社より、カゼインは和光純薬より購入した。脱脂粉乳は、四つ葉乳業製を使用した。ペプチド合成用試薬は島津製作所より購入した。その他の試薬は、特級以上のものを用いた。

2-2-2. 菌体外プロテアーゼの調製

L. helveticus CP790 株から菌体外プロテアーゼを精製するために、以下の操作を行った。最初に、CP790 株を保存プレートから、10 ml の 9% (wt / vol) 脱脂粉乳 (110℃ で 5 分間滅菌) に接種した。そして、37℃ で一晚培養してカード形成を確認後、全量を上記の 9% 脱脂粉乳 200 ml に接種して一晚 37℃ で培養した。次に、4 L の 9% 脱脂粉乳 (90℃ 達温殺菌) に全量添加して、発酵中の pH が 6.5 付近を保つように、5 規定の NaOH を添加しながら 37℃ で培養した。そして、対数増殖期中期 (OD 590 が 1.0 になった時点) に菌体を集菌し、菌体外プロテアーゼを前述の方法 [Yamamoto, 1993] に従って精製した。

すなわち、クエン酸ナトリウムを、全発酵液に 1 重量% となるように添加して乳蛋白質を可溶化し、続いて 5000 回転、20 分間の遠心分離を行い集菌した。得られた菌体を 20 mM 塩化カルシウム、50 mM β-グリセロリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) で洗浄した後、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 50 ml 加えて、37℃ で 30 分間保持した。次いで 10000 回転で 10 分間の遠心分離を行った後に上清液を採取し、粗抽出液とした。この粗抽出液を予め 5 mM エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) - 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8、TE 緩衝液) で平衡にした DEAE-セファロースカラム (5 ml) に通した。カラムを 0.3 M の塩化ナトリウムを含む TE 緩衝液 30 ml で洗浄後、1.0 M 塩化ナトリウムを含む TE 緩衝液 15 ml で溶出し、精製プロテアーゼ画分を得た。

2-2-3. カゼインからのペプチド混合物の調製

目的のペプチド混合物を得るために、1 g のカゼインを 100 ml の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.7) に溶解させた。続いて、10 µg の精製した *L. helveticus* CP790 株由来プロテアーゼを添加して、42℃ で 15 時間反応させた。その後、80℃ で 5 分間熱処理して酵素を失活させた。このペプチドを含む溶液を限外濾過膜 (OM010025、富士フィルター) にて濾過し、分子量 10000 以下のペプチド混合物を約 700 mg 得た。

2-2-4. ラットの血圧測定方法

血圧測定には、高血圧モデルラットである SHR の雄を日本チャールズリバー社より購入して用いた。実験動物用飼料は、日本クレア社製の CE-2 を与え、飲用水とともに自由摂取とした。飼育環境は、温度 24 ± 1℃、湿度 55 ± 5% で、12 時間の明暗サイクル (明期 8:00-20:00) とした。血圧測定には、18~25 週齢、体重 330~360 g の SHR を 1 群 5 匹で使用し、飲用水は自由摂取の状態で、試験サンプルの投与 12 時間前から投与後 10 時間まで断餌を行った。SHR の血圧測定は、次の方法に従って行った。すなわち、ペプチド混合物および、ペプチドは、胃ゾンデを用いて強制的に経口投与し、45℃ で 5 分間保温した後、非観血式血圧測定装置 (「PE-300」、ナルコバイオシステムズ) を用い、tail-cuff 法で収縮期血圧値を求めた。コントロール群には、0.01 M リン酸を含む生理食塩水 (PBS; pH 7.4) にカゼインを 0.05% になるように添加した溶液 (PBS-カゼイン溶液) を、試料群には PBS-カゼイン溶液にペプチドを溶解した液を投与した。PBS に溶解した合成ペプチドも同様に測定した。コントロール群とサンプル群の群間比較のための統計解析は、Student's t-test を用いた。本実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」[環境省, 1973] を遵守して実施した。

2-2-5. ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性は、既知の方法[Cushman, 1980]に従って行った。すなわち、ペプチドを含む溶液 80 μ l を Hip-His-Leu を含むホウ酸緩衝液(3.8 mM Hip-His-Leu、0.1 M ホウ酸、0.3 M NaCl; pH 8.3)200 μ l に添加し、37℃で 5 分間保温した後に、2 ミリユニットの ACE を添加した。さらに 37℃で 30 分間保温した後に、250 μ l の 1 規定 HCl を添加して酵素反応を停止した。遊離したヒプリル酸は、酢酸エチルで抽出後に 120℃で乾固し、溶媒を除去した。溶媒除去後、蒸留水 1 ml を加え、抽出されたヒプリル酸の 228 nm における吸光度を測定し、これを ACE 阻害活性とした。1 ユニットの ACE は、37℃、pH 8.3 の条件で、1 分間に Hip-His-Leu から 1 M のヒプリル酸を遊離する活性であると定義されている。ACE 阻害活性は下記式より算出した。

$$\text{ACE 阻害率} = [(A-B) / (A-C)] \times 100(\%)$$

A : 試料を含まない場合の 228 nm の吸光度

B : 試料を添加した場合の 228 nm の吸光度

C : 酵素及び試料を添加しない場合の 228 nm の吸光度

ACE の酵素活性を 50% 阻害するために必要な試料の濃度(μ M)を IC₅₀ とした。

2-2-6. 逆相 HPLC を使用した血圧降下ペプチドの精製

L. helveticus CP790 株由来の菌体外プロテアーゼでカゼインを分解して得られたペプチド混合物は、逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフ(HPLC)により分画した。HPLC は、日立製作所製のモデル L4000、L6000 そして L6200 を用い、分析カラムは日本ミリポア社製の μ -Bondasphare C-18 カラム(ϕ 3.9 \times 150 mm)を使用した。溶出は、流速 1.0 ml / min にて、溶液 A(0.1%トリフルオロ酢酸-H₂O)から、60 分後に 40%の溶液 B(0.1%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル)になる直線濃度勾配に設定して行った(溶出条件 1)。ペプチドの検出は、紫外光の 215 nm

で行った。さらに、分離したピークに含まれるペプチドのアミノ酸配列分析を行うために、逆相 HPLC の溶出条件を、流速 1.0 ml/min にて 10% の溶液 B から開始して 30 分後に 30% の溶液 B になるような緩やかな直線濃度勾配に設定して溶出を行った(溶出条件 2)。

2-2-7. ペプチドの配列分析及び化学合成

逆相 HPLC を用いて精製したペプチドのアミノ酸配列は、タンパク質一次構造分析装置(PPSQ-10、島津製作所)を使用して分析して同定した。同定したペプチドは、ペプチド合成機(PPSM-8、島津製作所)を使用して合成した。ペプチドを合成するためには、アミノ基がフルオレニルメトキシカルボニル基(Fmoc)で保護されたアミノ酸が結合した樹脂 20 μ mol を使用した。そして、アミノ基が Fmoc 基で保護された Fmoc-アミノ酸を 100 μ mol ずつ、目的ペプチドの C 末端側から N 末端方向に順次反応させてペプチド結合樹脂を得た。次にこのペプチド結合樹脂を 1 ml の反応液(1% エタンジチオール、5% アニソールを含むトリフルオロ酢酸)に懸濁し、室温で 2 時間反応させてペプチドを樹脂から切り離し、同時に側鎖保護基を外した。次に反応混合液をガラスフィルターで濾過した後、無水エーテル 10 ml を加えて生成したペプチドを沈澱させて、3000 回転で 5 分間遠心して分離した。その沈澱を無水エーテルで数回洗浄した後に、窒素ガスを吹き付けて乾燥した。このようにして得られた未精製の合成ペプチドを 0.1 規定の HCl 水溶液 2 ml に溶解した後に全量を C18 の逆相カラムを用いた HPLC で、前節 2-2-6. の溶出条件 1 の方法に準じて精製した。

合成したペプチドは、タンパク質一次構造分析装置(PPSQ-10、島津製作所)にて分析して、設計通りの配列であることを確認した。さらに、合成したペプチドは、6 規定の HCl で 20 時間加水分解した後にアミノ酸組成分析装置(800 シリーズ、日本分光)で分析して、設計通りのアミノ酸組成であることを確認した。

2-3. 結果

2-3-1. 血圧降下フラクションからのペプチドの単離精製

L. helveticus CP790 株由来の菌体外プロテアーゼを用いてカゼインを分解して得られたペプチド混合物から、血圧降下ペプチド作用を持つペプチドを単離精製した。本ペプチド混合物は、10 mg ずつ逆相 HPLC を用いて、6 つのフラクションに分取した(図 2-1-A)。この操作は 10 回繰り返して実施し、計 100 mg のペプチド混合物を分画した。得られた 6 つのフラクションを凍結乾燥後に PBS に溶解して、SHR に経口投与した。6 時間後の収縮期血圧値を測定して、投与前(0 時間時)の収縮期血圧値からの差を求めたところ、コントロール群と比較して、3 番のフラクションの投与群に有意な血圧降下作用が得られた(図 2-1-B)。次に、3 番のフラクションのペプチド約 20 mg を逆相 HPLC で再度分画して、4 つのフラクションに分け(図 2-2-A)、凍結乾燥後に PBS に溶解し、SHR に経口投与することで血圧降下作用を調べた。その結果、コントロール群と比較して、フラクション 3-D を投与した群に有意な血圧降下活性が得られた(図 2-2-B)。そこで、活性フラクション 3-D に含まれる主要ペプチドの精製を行った。

その結果、図 2-A 中に矢印(↓)で示した主要ピークから、10 種類のペプチドを精製することができた。それぞれのアミノ酸配列を決定したところ、10 種類のうち 4 種類のペプチドは β -カゼイン由来であり、別の 4 種類は、 α_{s2} -カゼイン、残り 2 種類は α_{s1} -カゼイン由来であった(表 2-1)。

2-3-2. 主要ペプチドの血圧降下活性と、ACE 阻害活性

活性フラクション 3-D から同定した 10 種類のペプチドの血圧降下活性を測定した。それぞれの合成ペプチドを、SHR の体重 1 kg 当たり 1.0 mg を経口投与して 6 時間後の収縮期血圧値を測定し、投与前(0 時間時)の収縮期血圧値からの差を求めた(表 2-1)。その結果、

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の配列を持つペプチドに、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用 (-24.1 ± 7.8 mmHg、 $p < 0.05$) が得られた。しかし、その他のペプチドでは有意な血圧降下作用は確認できなかった。従ってペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼによるカゼイン分解物中の主要な血圧降下ペプチドであると考えられた。

次に、合成した 10 種類のペプチドそれぞれの ACE 阻害活性を評価した (表 2-1)。その結果、血圧降下作用を示したペプチドである Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の ACE 阻害活性は、非常に弱いことがわかった ($IC_{50} = 1000$ μ M)。また、Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu は、比較的 ACE 阻害活性が高く ($IC_{50} = 20$ μ M)、血圧降下の傾向もみられたが、その血圧降下値は有意ではなかった。

2-3-3. 有効ペプチドの血圧降下作用の経時変化

SHR の体重 1 kg あたり、2.0 mg のペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を経口投与して、0、2、4、6、8、10、そして 24 時間後の収縮期血圧値を測定して、投与前 (0 時間時) の収縮期血圧値からの差を求めた (図 2-3)。その結果、コントロール群では、24 時間にわたり大きな血圧値の変化はみられなかったが、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を SHR の体重 1 kg 当たり 2 mg 投与した群では、コントロール群と比較して、2、4、6、8、10 時間後に有意な血圧降下作用が得られた (-20.2 ± 2.9 、 -26.3 ± 1.6 、 -31.5 ± 5.6 、 -25 ± 8.3 、 -22.7 ± 2.8 mmHg)。そして投与 24 時間後には、変化値はコントロール群と同じレベルに回復 (-2.9 ± 2.4 mmHg) した。

2-3-4. 有効ペプチドの血圧降下作用の用量依存性

血圧降下ペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の投与量と血圧降下値の関係を調べた。本ペプチドを SHR の体重 1 kg 当たり、0.2~2.0 mg

経口投与して 6 時間後の収縮期血圧値の変化を測定し、投与前(0 時間時)の収縮期血圧値からの差を求めた(図 2-4)。その結果、本ペプチドは、コントロール群と比較して、SHR の体重 1kg あたり、0.5~2.0 mg 投与の範囲で有意な血圧降下作用が認められた。

表 2-1 活性フラクションより同定したペプチドの血圧降下作用および
ACE 阻害作用

Sequence	Origin ¹	Systolic blood pressure ² (mmHg±SEM)	IC ₅₀ ³ (μM)
1. Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln	β : 169-175	-24.1 ± 7.8 *	1000
2. Leu-Gln-Ser-Trp	β : 140-143	-1.6 ± 9.6	500
3. Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu	β : 1-6	1.3 ± 6.7	>1000
4. Thr-Lys-Val-Ile-Pro	α _{S2} : 198-202	-9.2 ± 6.1	400
5. Ala-Met-Lys-Pro-Trp	α _{S2} : 189-192	-4.6 ± 11.6	580
6. Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu	α _{S1} : 104-109	-12.5 ± 11.1	22
7. Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys	α _{S2} : 190-197	-2.9 ± 5.9	300
8. Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val	β : 191-197	1.2 ± 9.8	>1000
9. Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro	α _{S1} : 143-147	-4.3 ± 6.6	>1000
10. Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys	α _{S2} : 189-197	0.6 ± 9.3	600

¹ Origin and the position in each casein molecule are indicated.

² Mean of five determinations.

³ The concentration of peptide needs to inhibit 50% of the ACE activity

* Different from control ($p < 0.05$).

(特許第 3782837 号で使用済)

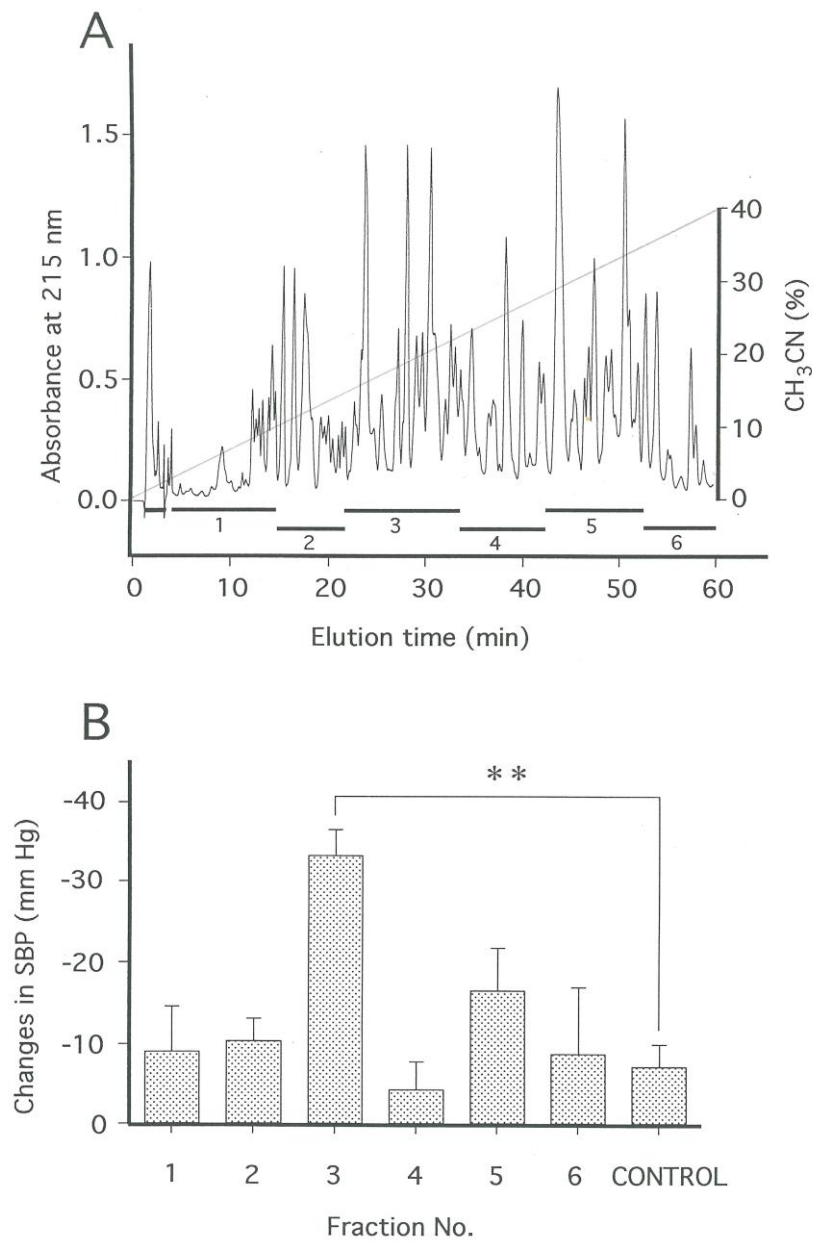


図 2-1 ペプチド混合物からの血圧降下フラクションの限定

A) 逆相 HPLC での溶出パターン

L. helveticus CP790 株由来の菌体外プロテアーゼでカゼインを分解して得られたペプチド混合物を 6 つのフラクションに分けた。

B) 各フラクションの血圧降下作用

各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。フラクション 3 は、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用を示した (** $p < 0.01$)。

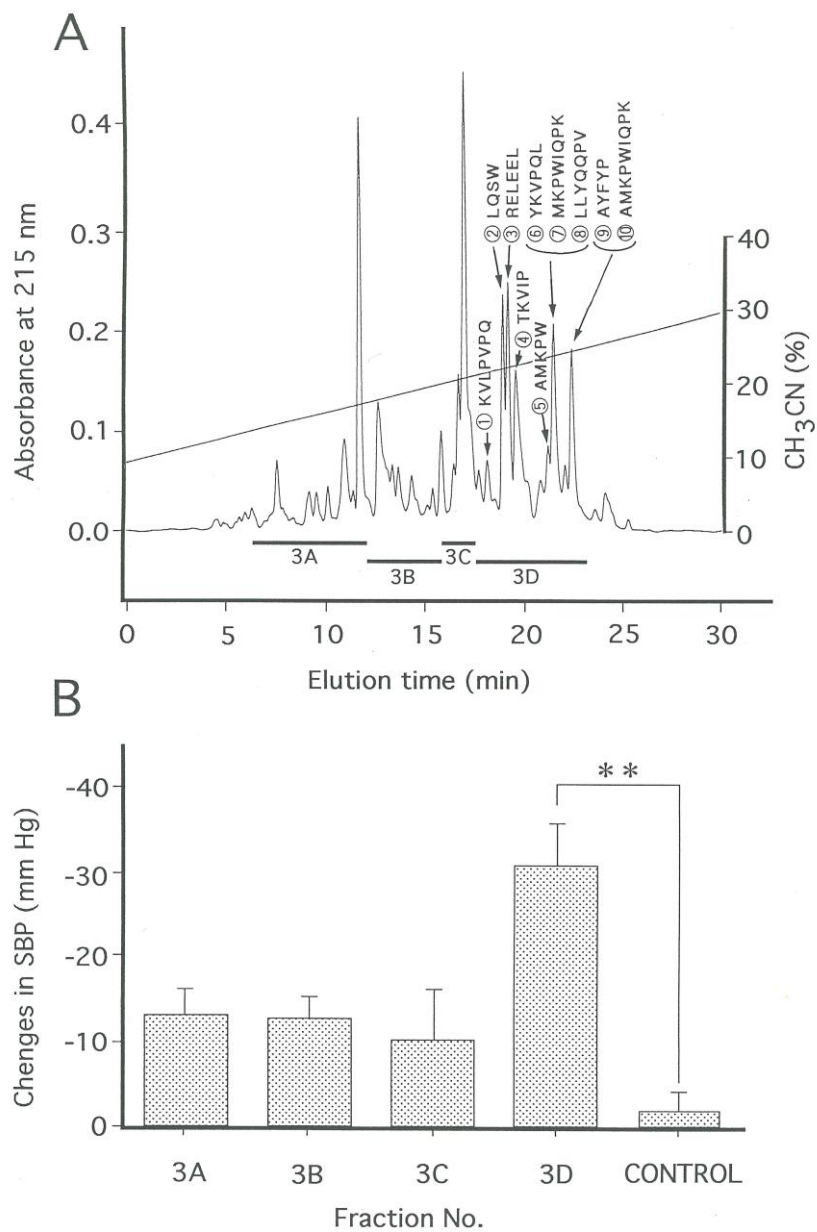


図 2-2 活性フラクションからの血圧降下ペプチドの精製

A) 逆相 HPLC での溶出パターン

血圧降下作用が得られたフラクション 3 を、さらに 4 つのフラクションに分けた。

B) 各フラクションの血圧降下作用

各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。フラクション 3D は、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用を示した (** $p < 0.01$)。フラクション 3D に含まれる主要ペプチドを矢印で示した(アミノ酸は 1 文字表記とした)。

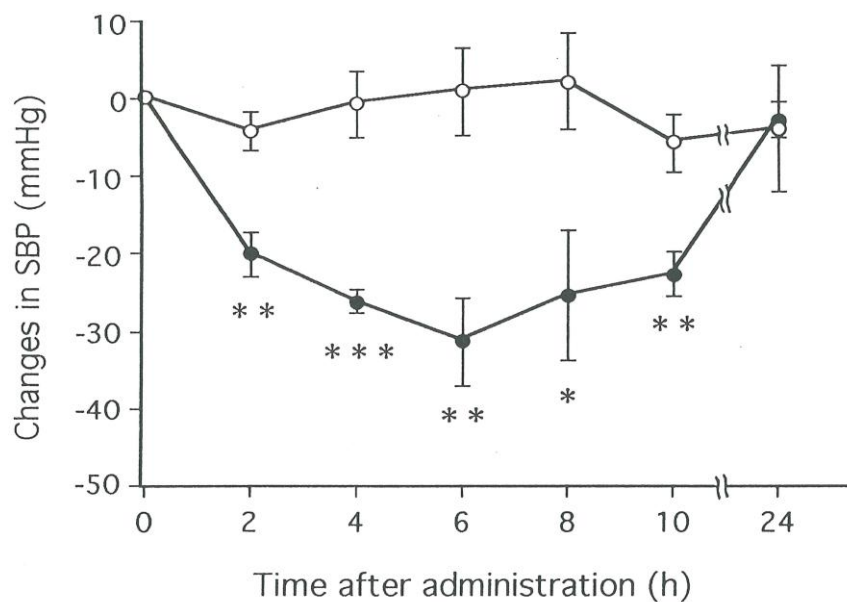


図 2-3 血圧降下ペプチドを SHR に単回経口投与したときの血圧降下値の経時変化

各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。コントロール群(○)は、0.05%のカゼインを含む PBS を投与し、ペプチド群(●)は、SHR の体重 1 kg あたり 2 mg の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を投与した。ペプチド群は、投与後 2 から 10 時間にわたり、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用を示した(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

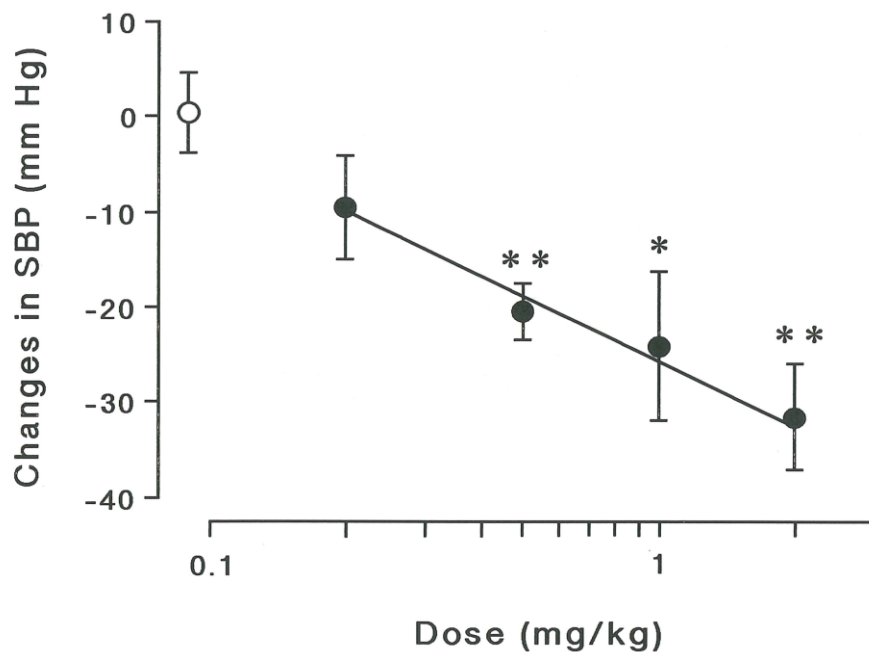


図 2-4 血圧降下ペプチドとの投与量と血圧降下値の関係

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を、SHR に経口投与して、6 時間後の収縮期血圧値の変化を測定し、投与前(0 時間時)の収縮期血圧値からの差を求めた。各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。コントロール群(\circ)は、0.05%のカゼインを含む PBS を投与し、ペプチド群(\bullet)は、SHR の体重 1 kg あたり 0.2~2.0 mg の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を投与した。コントロール群と比較して、ペプチド群は、0.5~2mg 投与の範囲で、有意な血圧降下作用を示した (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

2-4. 考察

今回の実験で、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼでカゼインを分解して得られたペプチド混合物から、SHR に経口投与した時の血圧降下作用を指標に、血圧降下ペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を精製することができた。本ペプチド混合物中に含まれる Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、ペプチドの定量結果から考察すると、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼにより、カゼインから効率的に生成されているものと考えられた。しかし、本ペプチドは、以前の報告において逆相 HPLC にて分析した時は、主要ペプチドとしては検出されていない [Yamamoto, 1994b]。その理由は、逆相の HPLC で分析した際に、おそらく別なペプチドが血圧降下ペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と同じ位置に溶出してきたために、主要ペプチドとして分離する事が困難であったからではないかと考えられた。

また以前の研究で、本ペプチド混合物を、SHR の体重 1kg あたり 15 mg を経口投与した場合は、6 時間後に最大の血圧降下作用が得られた [Yamamoto, 1994b]。今回の試験でも、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln ペプチドを SHR に経口投与した場合は、同様に投与 6 時間後に最大の血圧降下作用が得られた。定量の結果、本ペプチド混合物 15 mg には、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln が、少なくとも 0.39 mg 含まれていた。これらの結果と、本ペプチドは、SHR の体重 1 kg あたり 0.5 mg 投与したときに血圧降下作用が見られていたことから考察すると、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、本ペプチド混合物において血圧降下作用を発揮する主要なペプチドであることが示された。

これまでに *L. helveticus* を含むスターターを用いた発酵乳から精製された血圧降下ペプチド Ile-Pro-Pro と Val-Pro-Pro は、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼによるカゼイン分解物からは見つからない。これら Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、*L. helveticus* の発酵後期に生成量が増加するが、それは、発酵初期段階で菌体外プロテアーゼによって β カゼインから生成された 28 から 29 アミノ酸からなる比較的大きなペプチドが、菌体内に取り込まれた後、さらに複数のペプチダーゼによる分解を受けて生成され则认为られている [Yamamoto, 1993;

Ueno, 2004]。一方、今回の研究で見出された Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、*L. helveticus* 発酵乳では、発酵初期段階においては微量検出されたが、発酵が進むにつれて減少し、発酵後期では検出されなかった(データ未発表)。Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、発酵の初期段階では、*L. helveticus* の菌体外プロテアーゼの働きによりカゼインから遊離し、発酵乳中に蓄積していくと考えられる。しかし、発酵で生産される乳酸で発酵乳の pH が低下すると、菌体外プロテアーゼ活性も低下していくために、発酵の中期以降は、カゼインからの本ペプチドの生成量も減っていくと推定される。さらに発酵乳中に蓄積した本ペプチドも、乳酸菌の増殖のための窒素源として、他のペプチド群とともに菌体内に取り込まれて利用されていくため、最終的には、*L. helveticus* 発酵乳中での本ペプチドの含有量が減少した可能性が考えられた。

近年、各社よりペプチド素材が商品化されており、ペプチドは、タンパク質やアミノ酸より消化吸収性が良いことから、バランス栄養食品やスポーツ食品等にも使用されている。カゼインを *L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼで分解して生じたペプチド混合物は、ペプシン分解物と比較して苦みが少ないことが一つの特徴である。ペプシン分解物では、ペプチダーゼ分解を併用して苦みを除去している例が多いが、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼの場合は一回の分解で苦味の少ないペプチド素材開発が行えると考えられる。さらに *L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼでカゼインを分解して得られたペプチド混合物は、機能性が未知のペプチドを数多く含む[Yamamoto, 1993]ことから、新規な生理機能を持つペプチドが存在する可能性もあり、今後の研究が期待される。また近年は、本研究のような対照群と複数サンプル群の差を検出する最適な統計方法として、分散分析後に、Dunnett 検定などの多重比較検定が推奨されている。今後の研究には、実験精度の向上に加えて、より最適な統計手法を選定していく必要があると考える。

以上の結果、*L. helveticus* CP790 株菌体外プロテアーゼでカゼインを分解して得られた Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、逆相 HPLC にて比較的容易に測定しやすいことと、本カゼイン分解物中の血圧降下作用を発揮する主要成分と考えられることから、今後、血圧降下作用を期待した機能性食品へ応用する際の有効成分としての利用可能性が示された。

2-5. 参考文献

- Cheung, HS., Wang, F L., Ondetti, MM., Sabo, EF., Cushman, DW.
Binding of peptide substrates and inhibitors of
angiotensin-converting enzyme. J. Biol. Chem. 1980; 255: 401-407.
- Church, FC., Swaisgood, HE. Porter, DH., Catignani, GL.
Spectrometric assay using o-phthaldialdehyde for determination
of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci.
1993; 66: 1219-1227.
- Cushman, DW., Cheung, HS. Spectrophotometric assay and properties
of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem.
Pharmacol. 1971; 20: 1637-1648.
- Dabrowski, K. Protein digestion and amino acid absorption along the
intestine of the common carp (*Cyprinus carpio* L.), a stomachless
fish: an in vivo study. Reprod. Nutr. Dev. 1986; 26: 755-766.
- Fujita, H., Yoshikawa M. LKPNM: a prodrug-type ACE- inhibitory
peptide derived from fish protein, Immunopharmacology 1999; 44:
123-127.
- Hara, H., Funabiki, R., Iwata, M., Yamazaki, K. Portal absorption of
small peptides in rats under unrestrained conditions. J. Nutr.
1984; 114: 1122-1129.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U.,
Takemoto, S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk
casein in spontaneously hypertensive rats. Comp. Biochem. Physiol.
1990; 96: 367-371.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N., Suzuki, H.
Studies on the active site and antihypertensive activity of
angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein.
Agric. Biol. Chem. 1987a; 51: 1581-1586.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Suzuki, H. Angiotensin
I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal
hexapeptide of α s1-casein. Agric. Biol. Chem. 1987b; 51: 2557-2561.

- Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T., Tanaka, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.* 1989; 53: 1077-1081.
- Maruyama, S., Nakagome, K., Tomizuka, N., Suzuki, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. 11. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 1985; 49: 1405-1409.
- Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K., Shimizu, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1993; 57: 695-697.
- Matsui, T. Kawasaki, T. Antihypertensive Effect of bioactive peptides derived from food proteins -Development of antihypertensive food with bioactive sardine muscle peptide (Val-Tyr) - [In Japanese]. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 2000; 53: 77-85.
- Morita, A., Chung, YC., Freeman, HJ., Erickson, RH., Sleisenger, MH., Kim, YS. Intestinal assimilation of a proline-containing tetrapeptide. Role of a brush border membrane postproline dipeptidyl aminopeptidase IV. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 610-616.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 1995a; 78: 777-783.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy. Sci.* 1995; 78: 1253-1257.
- Ondetti, MA., Rubin, B., Cushman, DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196: 441-444.

- Ueno, K., Mizuno, S., Yamamoto, N. Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in the carboxyl terminal processing of antihypertensive peptides in *Lactobacillus helveticus* CM4. Lett. Appl. Microbiol. 2004; 39: 313-318.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Biochem. 1993; 114: 740-745.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano T. Antihypertensive effect of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 1994a; 58: 776-778.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Dairy Sci. 1994b; 77: 917-922.
- Yokoyama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992; 56: 1541-1545.
- 環境省 動物の愛護及び管理に関する法律. 1973.
<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S48/S48HO105.html>
(accessed 1.4.2014)

第3章 血圧降下ペプチドの作用メカニズム解析

3-1. 緒言

食品から見出された ACE 阻害作用を持つペプチドは、必ずしも全てが、血圧降下作用を期待した機能性食品に利用できるわけではない。例えば、食品中から ACE 阻害ペプチドが見出されても、その含有量が微量である場合は、現実的な経口摂取量では効果が期待出来ない可能性がある。それ以外には、*in vitro* 試験では強い ACE 阻害活性を示しているが、*in vivo* 試験では血圧降下作用を示さない場合が知られている [Fujita, 1999]。その理由としては、ACE 阻害ペプチドとして見出されたペプチドが、単に ACE の基質として作用していた場合 [吉川, 1993] や、経口投与後に消化酵素で分解を受けて、ACE 阻害活性が消失した場合などが考えられる。

また、ジおよびトリペプチドのような短いペプチドは、そのままの形態で、小腸上皮細胞の刷子縁膜にある、H⁺/ペプチド共輸送体 (peptide transporter 1: PEPT1) を介して吸収されることが知られている [Liang, 1995; Miyamoto, 1996]。食品由来の ACE 阻害ペプチドも、その種類によって PEPT1 に対する結合親和性が異なることが示唆されている [松井, 2003]。従って、ACE 阻害ペプチドが腸管からの吸収性が悪い場合は、生体内で作用を発揮するために必要な十分量のペプチドが体内移行できないことで、結果として血圧降下作用が発揮されない可能性も考えられる。

従って、生体内で血圧降下作用を発揮する ACE 阻害ペプチドを見出すためには、上記のような、経口バイオアベイラビリティを考慮して選抜する必要がある。一方で、ACE 阻害活性を持つペプチドで知られている鰹節ペプチド (Leu-Lys-Pro-Asn-Met) は、生体内で分解を受けて真の ACE 阻害ペプチドである Leu-Lys-Pro に転換するプロドラッグタイプのペプチドであることが知られている [藤田, 1996]。

そこで本研究では、2 章の研究で見出したペプチドである、ACE 阻害活性が弱い血圧降下作用を示す Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の作用メカニズムについて、経口投与後のペプチドの消長から探ることを目的として、人工消化試験を行った。その結果、本ペプチドをカルボキシペ

プチダーゼ A で消化して得られた分解物の中から、ACE 阻害作用を示すペプチドである Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro を見出した。本ペプチドを SHR に経口投与したところ、分解前のペプチドと同様に血圧降下作用を示した。従って、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の作用メカニズムは、経口投与後に消化酵素で部分分解を受けて生じたペプチドによる ACE 阻害作用であることが示唆された。

3-2. 材料と実験方法

3-2-1. 試薬

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu)、ACE、カルボキシペプチダーゼ A、ペプシンおよび、パンクレアチンはシグマ社より、カゼインは和光純薬より購入した。その他の試薬は、特級以上のものを用いた。

3-2-2. ラットの血圧測定方法

血圧測定には、高血圧モデルラットである SHR の雄を日本チャールズリバー社より購入して用いた。実験動物用飼料は、日本クレア社製の CE-2 を与え、飲用水とともに自由摂取とした。飼育環境は、温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ で、12 時間の明暗サイクル（明期 8:00-20:00）とした。血圧測定には、18~25 週齢、体重 330~360 g の SHR を 1 群 5 匹で使用し、飲用水は自由摂取の状態で、試験サンプルの投与 12 時間前から投与後 10 時間まで断餌を行った。SHR の血圧測定は、次の方法に従って行った。すなわち、ペプチド混合物および、ペプチドは、胃ゾンデを用いて強制的に経口投与し、 45°C で 5 分間保温した後、非観血式血圧測定装置（「PE-300」、ナルコバイオシステムズ）を用い、tail-cuff 法で収縮期血圧値を求めた。コントロール群には、0.01 M リン酸を含む生理食塩水 (PBS; pH 7.4) にカゼインを 0.05% になるように添加した溶液 (PBS-カゼイン溶液) を、試料群には PBS-カゼイン溶液にペプチドを溶解した液を投与した。PBS に溶解した合成ペプチドも同様に測定した。コントロール群とサンプル群の群間比較のための統計解析は、Student's t-test を用いた。本実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」[環境省, 1973] を遵守して実施した。

3-2-3. ACE 阻害活性の測定方法

ACE 阻害活性は、既知の方法[Cushman, 1971]に従って行った。すなわち、ペプチドを含む溶液 80 μ l を Hip-His-Leu を含むホウ酸緩衝液(3.8 mM Hip-His-Leu、0.1 M ホウ酸、0.3 M NaCl; pH 8.3)200 μ l に添加し、37℃で 5 分間保温した後に 2 ミリユニットの ACE を添加した。さらに 37℃で 30 分間保温した後に、250 μ l の 1 規定 HCl を添加して酵素反応を停止した。1 ユニットの ACE は、37℃、pH 8.3 の条件で、1 分間に Hip-His-Leu から 1 M のヒプリル酸を遊離する活性であると定義されている。遊離したヒプリル酸は、酢酸エチルで抽出後に 120℃で乾固し、溶媒を除去した。溶媒除去後、蒸留水 1 ml を加え、抽出されたヒプリル酸の 228 nm における吸光度を測定し、これを ACE 阻害活性とした。ACE 阻害活性は下記式より算出した。

$$\text{ACE 阻害率} = [(A-B) / (A-C)] \times 100(\%)$$

A : 試料を含まない場合の 228 nm の吸光度

B : 試料を添加した場合の 228 nm の吸光度

C : 酵素及び試料を添加しない場合の 228 nm の吸光度

ACE の酵素活性を 50% 阻害するために必要な試料の濃度(μ M)を IC₅₀ とした。

3-2-4. ペプチドの人工消化試験

合成ペプチドの各種消化酵素による反応は、以下のように行った。すなわち、ペプシンによる消化試験は、100 μ g の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln ペプチドを 200 μ l の 0.1M トリス-塩酸溶液(pH 2.0)に溶解させて 1 μ g の酵素加えた後に、37℃で 4 時間反応させた。パンクレアチンによる消化試験は、5 μ g の酵素と、100 μ g の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln ペプチドを 200 μ l の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)に溶解させた後に、37℃で 4 時間反応させた。カルボキシペプチダーゼ A による消化試験は、50 μ g の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln ペプチドを 100 μ l の反応緩衝液

(350 mM KCl、40 mM Tris-HCl; pH 7.5)に溶解した後、10 ユニットのカルボキシペプチダーゼ A を加えて 37℃で 10 時間反応させた。上記すべての酵素反応は、反応終了後に 100℃で 10 分間の熱処理を行い、酵素を失活させた。

3-2-5. 人工消化物の逆相 HPLC による分析

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln ペプチドを、カルボキシペプチダーゼ A により分解したものは、逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフ (HPLC)により分析した。HPLC は、日立製作所製のモデル L4000、L6000 そして L6200 を用い、逆相カラムは、日本ミリポア社製の μ -Bondasphere C-18 カラム(ϕ 3.9 \times 150 mm)を使用した。溶出は、流速 1.0 ml / min にて、溶液 A(0.1%トリフルオロ酢酸-H₂O)から、60 分後に 40%の溶液 B(0.1%トリフルオロ酢酸-アセトニトリル)になる直線濃度勾配の条件で行った。ペプチドの検出は、紫外光の 215 nm で行った。

3-2-6. ペプチドの配列分析及び化学合成

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln をカルボキシペプチダーゼ A で分解することで生成したペプチドは、全自動タンパク質一次構造分析装置 (PPSQ-10、島津製作所)によるアミノ酸配列分析と、6 規定の HCl で 20 時間加水分解したあとにアミノ酸組成分析装置 (800 シリーズ、日本分光) でアミノ酸組成を分析することで、同定した。

同定したペプチドは、ペプチド合成機 (PPSM-8、島津製作所)で合成した。すなわち、ペプチド合成には、アミノ基がフルオレニルメトキシカルボニル基 (F-moc)で保護されたアミノ酸が結合した樹脂 20 μ mol を使用し、目的のアミノ酸配列に従って、アミノ基が Fmoc 基で保護された Fmoc-アミノ酸を 100 μ mol ずつ、C 末端に位置するアミノ酸より順次反応させてペプチド結合樹脂を得た。次にこのペプチド結合樹脂を 1 ml の反応液 (1%エタンジチオール、5%アニソールを含むトリフルオロ酢酸) に懸濁し、室温で 2 時間反応させてペプチドを樹脂から切り離し、同時

に側鎖保護基を外した。次に反応混合液をガラスフィルターで濾過した後、無水エーテル 10 ml を加えて生成したペプチドを沈澱させて、3000 回転で 5 分間遠心して分離した。その沈澱を無水エーテルで数回洗浄した後に、窒素ガスを吹き付けて乾燥した。このようにして得られた未精製の合成ペプチドを 0.1 規定の HCl 水溶液 2 ml に溶解した後に全量を C18 の逆相カラムを用いた HPLC で、前節 2-2-6. の溶出条件 1 の方法に準じて精製した。

合成したペプチドは、タンパク質一次構造分析装置 (PPSQ-10、島津製作所) にて分析して、設計通りの配列であることを確認した。さらに、合成したペプチドは、6 規定の HCl で 20 時間加水分解したあとにアミノ酸組成分析装置 (800 シリーズ、日本分光) で分析して、設計通りのアミノ酸組成であることを確認した。

3-3. 結果

3-3-1. 血圧降下ペプチドの人工消化試験

今回の試験では、ACE 阻害活性が弱い血圧降下ペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を消化酵素で人工消化試験を行うことにより、血圧降下作用メカニズムの一端を探った。その結果、ペプシンと Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln を反応させた場合は、消化されず、かつ ACE 阻害活性も上昇しなかったが、本ペプチドと、パンクレアチン及びカルボキシペプチダーゼ A で反応させた場合は、反応液の ACE 阻害活性の上昇が確認された(データ未発表)。そこで、反応溶液中で ACE 阻害作用を発揮しているペプチドを同定するために、血圧降下ペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln をカルボキシペプチダーゼ A で反応させた溶液を逆相 HPLC にて分析した。その結果、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln が溶出したピークの直後に新規なピークが見出された。このピークを分取してアミノ酸組成および配列分析を行ったところ、分解前のペプチドの C 末端に位置するグルタミン残基が欠失したペプチドである、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro であることが判った(図 3-1)。このような Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の C 末端の Gln 残基が欠失したペプチドは、パンクレアチンによる反応でも生じた(データ未発表)。

そこで、同定された Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro ペプチドを化学合成して ACE 阻害活性を調べたところ、反応前のインタクトな状態のペプチドと比較して ACE 阻害活性が上昇していることが判った($IC_{50} = 5 \mu M$)。

さらに、2 章で同定したペプチドの中で、ACE 阻害活性が高かったが、SHR への投与で血圧降下作用が見られなかった Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu ($IC_{50} = 20 \mu M$)ペプチドについても、同様に人工消化による ACE 阻害活性の変化を調べた。その結果、本ペプチドは、パンクレアチン消化で部分分解されて、C 末端にプロリンが露出した Tyr-Lys-Val-Pro の配列のペプチドが生じた。本ペプチドを化学合成して ACE 阻害活性を評価したところ、その活性は、分解前より低下($IC_{50} > 1000 \mu M$)していた。

3-3-2. 生成したペプチドの血圧降下作用の経時変化

ペプチド **Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro** の血圧降下作用の経時変化を測定した。化学合成したペプチドを、SHR に対して体重 1 kg あたり 1.0 mg の用量になるように経口投与し、コントロール群(0.05%カゼイン投与群)との血圧降下値を比較した。血圧測定は、非観血式血圧測定装置(型式 PE-300、ナルコバイオシステムズ)を用い、tail-cuff 法で収縮期血圧値を求めた。その結果、ペプチド **Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro** は、コントロール群に対して、投与後 2~8 時間後に有意な血圧降下作用が得られた。結果を(投与前収縮期血圧値 - 投与後収縮期血圧値) \pm SEM として図 3-2 に示した。

3-3-3. 生成したペプチドの血圧降下作用の用量依存性

ペプチド **Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro** について、血圧降下作用における用量依存性を調べた。即ち、本ペプチドを SHR の体重 1 kg あたり、0.1、0.3、1.0 mg を経口投与し、投与 6 時間後の収縮期血圧値を測定して、投与前(0 時間時)の収縮期血圧値からの差を求めた(図 3-3)。その結果、コントロール群と比較して、SHR の体重 1 kg あたり、0.3~1.0 mg 投与の範囲で、有意な血圧降下作用が認められた。

3-3-4. 生成したペプチドの活性中心の評価

血圧降下作用を示したペプチドである **Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln** について、N 末端や C 末端よりアミノ酸残基を 1 つずつ減らしたペプチドを設計して化学合成した。それらの ACE 阻害活性を評価した結果を表 3-1 に示した。その結果、**Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln** および **Val-Leu-Pro-Val-Pro** にも若干の ACE 阻害活性が見られたものの、**Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro** より強い ACE 阻害活性を示すペプチドは得られなかった。

表 3-1 合成ペプチドの ACE 阻害活性

Sequence	IC ₅₀ (μM) ¹
Lys - Val - Leu - Pro - Val - Pro - Gln	1000
Lys - Val - Leu - Pro - Val - Pro	5
Lys - Val - Leu - Pro - Val	> 1000
Lys - Val - Leu - Pro	890
Lys - Val - Leu	> 1000
Val - Leu - Pro - Val - Pro - Gln	250
Leu - Pro - Val - Pro - Gln	> 1000
Pro - Val - Pro - Gln	> 1000
Val - Pro - Gln	> 1000
Val - Leu - Pro - Val - Pro	150
Leu - Pro - Val - Pro	> 1000
Pro - Val - Pro	> 1000

¹The concentration of peptide needed to inhibit 50% of the ACE activity

(特許第 3665663 号で使用済)

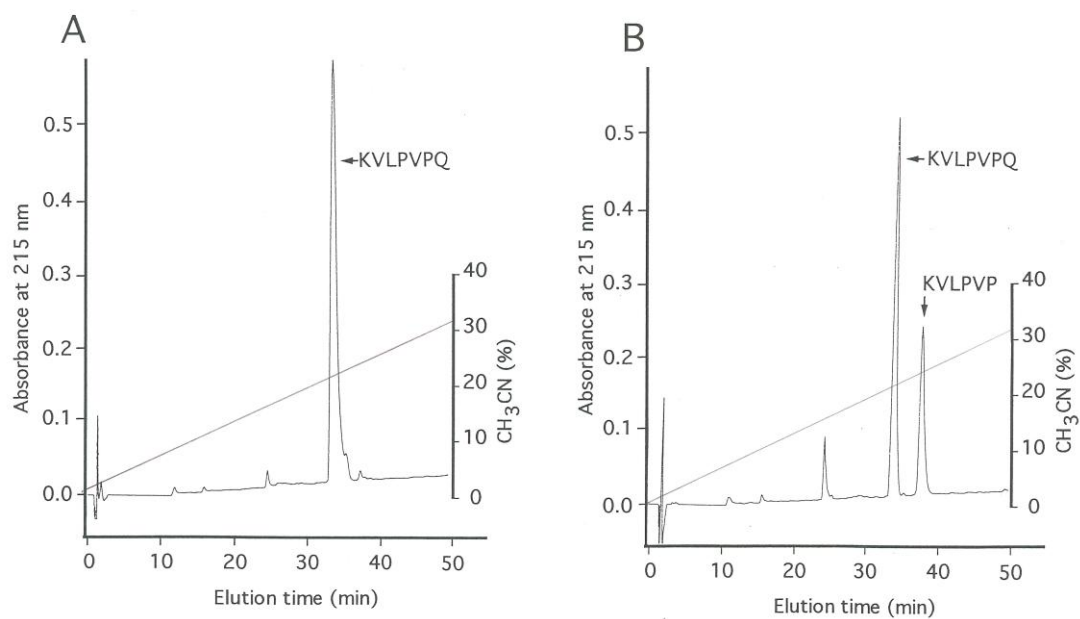


図 3-1 血圧降下ペプチドをカルボキシペプチダーゼ A で処理したときの
逆相 HPLC による溶出パターン

A) 処理前の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の溶出パターン

B) カルボキシペプチダーゼ A で 10 時間処理した後の逆相 HPLC に
おける溶出パターン

ペプチドのアミノ酸列は、図中矢印に一文字表記で示した。

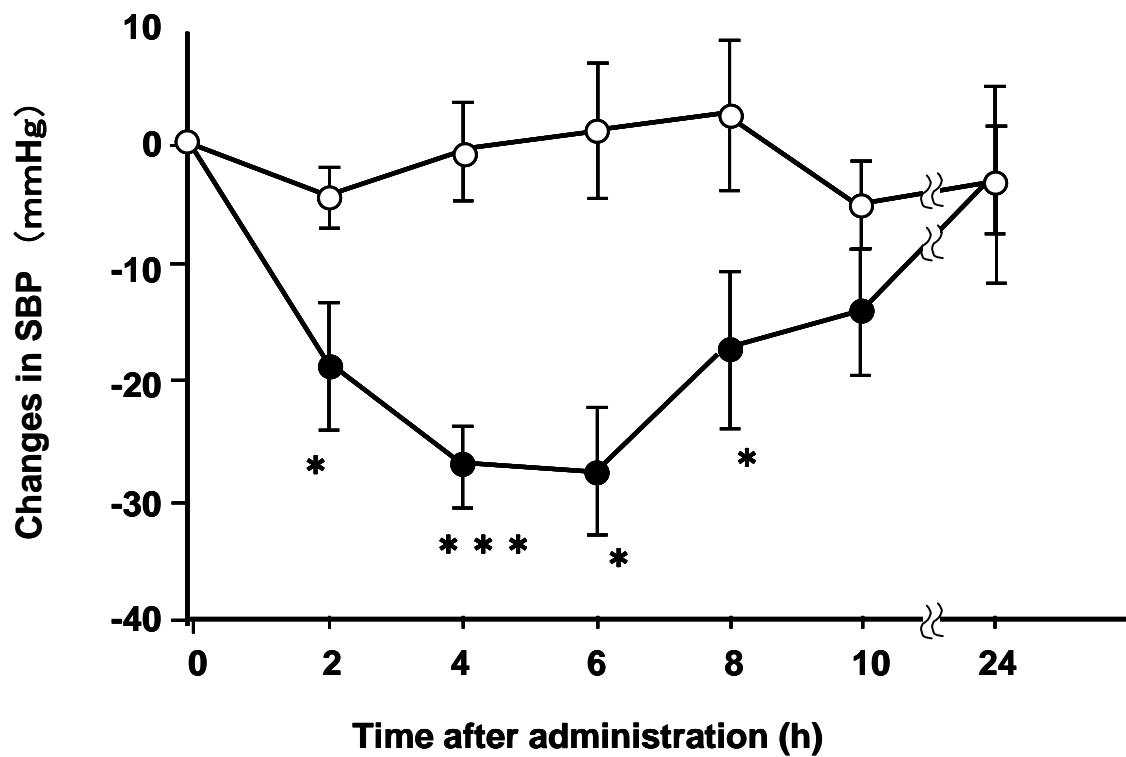


図 3-2 ACE 阻害ペプチドを SHR に単回経口投与したときの収縮期血圧値の経時変化

各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。コントロール群(○)は、0.05%のカゼインを含む PBS を投与し、ペプチド群(●)は、SHR の体重 1 kg あたり 1.0 mg の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro を投与した。投与後 2～8 時間にわたり、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用を示した(* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)。

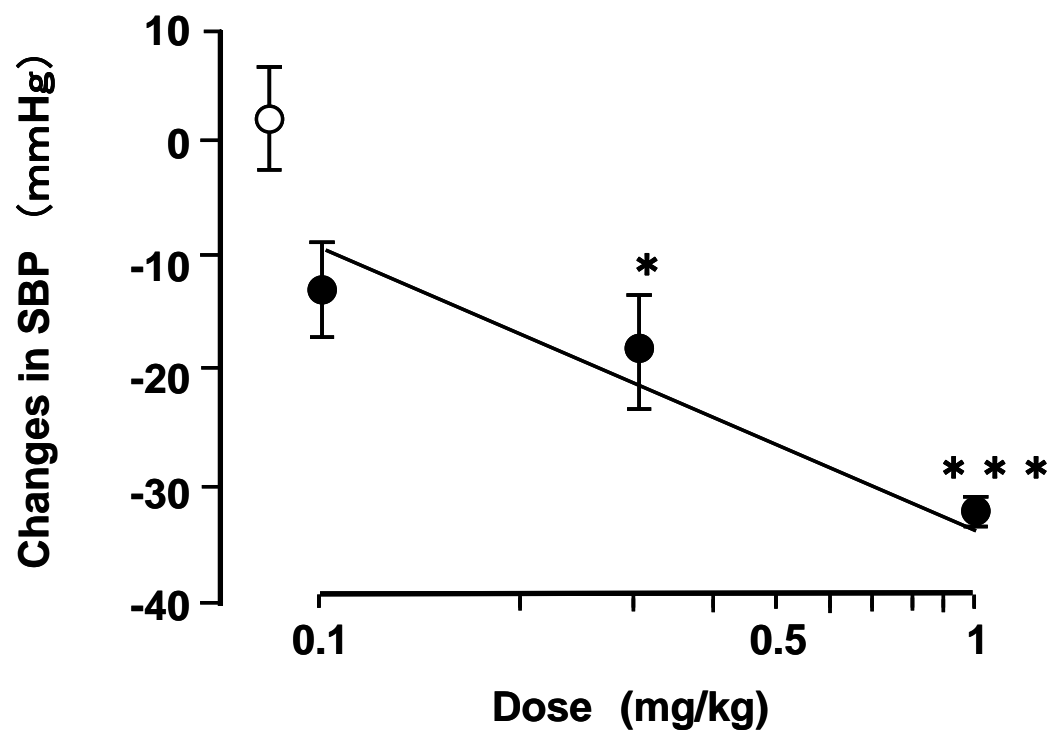


図 3-3 ACE 阻害ペプチドとの投与量と血圧降下値の関係

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro を SHR に経口投与し、6 時間後の血圧降下値を測定した。各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。コントロール群(○)は、0.05%のカゼインを含む PBS を投与し、ペプチド群(●)は、SHR の体重 1 kg あたり 0.1 ~ 1.0 mg の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro を投与した。本ペプチドは、0.3 ~ 1.0 mg 投与の範囲で、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用を示した(* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)。

3-4. 考察

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、ACE 阻害活性がほとんど認められなかったが、SHR への経口投与で血圧降下作用を発揮したことから、その作用メカニズムを探索した。ACE 阻害ペプチドのなかで、C 末端に Pro 残基を持つものは数多く報告されており [Cheung, 1980; Ferreira, 1970; Matsumura, 1993; Ondetti, 1971]、*L. helveticus* を用いて 24 時間発酵させた発酵乳から精製された血圧降下作用を持つ ACE 阻害ペプチド、Val-Pro-Pro や Ile-Pro-Pro [Nakaura, 1995a] も ACE を阻害するために C 末端 Pro 残基が重要だと考えられている。

Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、その配列中に Pro 残基を内在することから、消化酵素の分解を受けて Pro 残基が露出し、ACE 阻害活性を発揮する可能性が考えられた。従って、SHR への経口投与後の本ペプチドの消長を探ることから作用メカニズムを推定すべく、人工消化試験を実施した。消化酵素としては、胃から小腸での消化を想定して、ペプシンやパンクレアチンおよび、カルボキシペプチダーゼ A を用いた。

人工消化試験の結果、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、パンクレアチンや、カルボキシペプチダーゼ A の処理で部分分解を受け、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro という配列のペプチドを生じた。このペプチドの ACE 阻害活性 (IC₅₀) は 5 μ M であり、分解前の配列のものと比較して活性が 200 倍以上に上昇した。

従って、血圧降下ペプチド Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln が SHR で血圧降下作用を示す作用メカニズムとしては、本ペプチドが消化管内で部分分解されて C 末端に Pro 残基が露出したペプチドによる ACE 阻害作用である可能性が考えられた。さらに、SHR を用いた血圧降下作用の用量依存性を評価した結果、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro は、経口投与したペプチドの用量で比較すると、分解前の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln よりも強い血圧降下作用を示した。この結果は、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro は、最初から ACE 阻害活性を保有するために、消化管内で分解を受けないと活性が発現しない Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln よりも、より効率的に血圧降下作用を発揮することができたからではないかと考えられる。この結果からは、本ペプチドの C 末端の Gln アミノ酸が最初から除去さ

れたペプチド素材を開発することで、より強力な血圧降下ペプチドの提供ができる可能性が示された。

また、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro は、その配列内部に Pro 残基を保有していることから、ACE 阻害作用を示す配列がさらに内在している可能性があった。そこで、N 末端、C 末端からアミノ酸残基をひとつずつ削減したペプチドを合成して ACE 阻害活性を測定したが、いずれの ACE 阻害活性は低下した。そこで、今回見出した血圧降下ペプチドの C 末端 Gln 残基が外れた、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro においては、C 末端の Pro 残基が ACE 阻害活性発現に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

一方で、第 2 章の研究において、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼでカゼインを分解して得たペプチド混合物からは、ACE 阻害活性が比較的高い ($IC_{50} = 22 \mu M$) が、血圧降下作用が弱い Thr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu が見いだされていた。本ペプチドは、パンクレアチン処理を行ったところ、部分分解されて、C 末端に Pro 残基が露出した Thr-Lys-Val-Pro が生成された。しかし、本ペプチドの ACE 阻害活性は低下した。そこで、ACE 阻害作用をペプチドが発揮するためには、C 末端に Pro 残基を保有する以外にも、ペプチド全体の立体構造や、ACE との結合のしやすさなどの別な要因も関与していることが示唆された。

アミノ酸が数個からなる小さなペプチドは、消化管において、消化酵素の分解を受けずに吸収されるメカニズムがあることが知られている [Dabrowski, 1986; Hara, 1984; Morita, 1983]。例えば、血圧降下作用を持つ ACE 阻害ペプチドの Val-Pro-Pro は、Caco-2 細胞を用いた透過試験の結果、腸の管腔側に相当する Caco-2 細胞の上皮面から取り込まれ、細胞の反対側(基底側)に分解を受けずに、そのままの形態を保って透過し、そのメカニズムは拡散であることが報告されている [Satake, 2002]。さらに、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro 含む発酵乳を SHR に経口投与すると、その SHR の動脈抽出物から Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro が検出された [Masuda, 1996]。従って、ACE 阻害ペプチドである Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、腸管で吸収された後に、標的部位に到達して血圧降下作用を発揮していることが判っている。Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro においても、Caco-2 細胞を用いた透過試験において、Val-Pro-Pro と同様に、そ

のままの形態を保った状態で、拡散により透過することが報告された [Sun, 2009]。従って、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro においても、腸管で吸収されて、そのままの形態を保ったままで標的部位に到達して効果を発揮している可能性が考えられた。Caco-2 細胞を用いた試験では、他にも、オリゴペプチドの Gly-Gly-Tyr-Arg [Shimizu, 1997] や、ACE 阻害ペプチドの Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg [Vermeirssen, 2002] も、そのままの形態を保った形で透過することが報告されている。しかし、*in vivo* 試験において実際に血中や組織中から検出された ACE 阻害ペプチドの報告については、Val-Pro-Pro や Ile-Pro-Pro または、Val-Tyr [Matsui, 2002] など、ジまたはトリペプチドに限定されているために、今後の研究による解明が期待される。

ACE 阻害ペプチドのなかには、他の生理機能を併せ持つペプチド、あるいはその逆のパターンのケースも報告されている。牛血清アルブミン由来のペプチド Albstensin Af(208-216) は、ACE 阻害活性に加えて回腸の収縮・弛緩作用を併せ持つ [千葉, 1991]。ホエー由来オピオイドペプチドの β -casomorphin7 や β -lactorphin については、ACE 阻害作用も示すことが知られている [Meisel, 1994; Mullally, 1996]。さらに、今回の研究で見出した血圧降下ペプチドである Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は β カゼイン中の 169-175 番目の配列から遊離したペプチドであるが、それよりアミノ酸が一残基分だけ C 末端にシフトした 170-176 番目の配列から遊離した Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys のペプチドは、抗酸化作用を有することが知られている [Rival, 2001]。このように、乳由来タンパク質から自然生成されたペプチドには、複数の機能性を持つものや、その近傍の配列からは、別の機能を有するペプチドが見出されているため、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro または Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、ACE 阻害や血圧降下作用以外の機能性も併せ持つ可能性があり、今後の研究により解明が期待される。

また近年は、本研究のような対照群と複数サンプル群の差を検出する最適な統計方法として、分散分析後に、Dunnett 検定などの多重比較検定が推奨されている。今後の研究には、実験精度の向上に加えて、より最適な統計手法を選定していく必要があると考える。

3-5. 参考文献

- Cheung, HS., Wang, F L., Ondetti, MM., Sabo, EF., Cushman, DW.
Binding of peptide substrates and inhibitors of
angiotensin-converting enzyme. J. Biol. Chem. 1980; 255: 401-407.
- Cushman, DW., Cheung, HS. Spectrophotometric assay and properties
of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem.
Pharmacol. 1971; 20: 1637-1648.
- Dabrowski, K. Protein digestion and amino acid absorption along the
intestine of the common carp (*Cyprinus carpio* L.), a stomachless
fish: an in vivo study. Reprod. Nutr. Dev. 1986; 26: 755-766.
- Ferreira, SH, Bartley, DC., Greene, LJ. Isolation of bradykinin -
potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. Biochemistry.
1970; 9: 2583-2593.
- Fujita, H., Yoshikawa, M. LKPNM: a prodrug-type ACE- inhibitory
peptide derived from fish protein. Immunopharmacology 1999; 44:
123-127.
- Hara, H., Funabiki, R., Iwata, M., Yamazaki, K. Portal absorption of
small peptides in rats under unrestrained conditions. J. Nutr.
1984; 114: 1122-1129.
- Liang, R., Fei, YJ., Prasad, PD., Ramamoorthy, S., Han, H.,
Yang-Feng, TL., Hediger, MA. Ganapathy, V., Leibach, FH.
Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional
expression, and chromosomal localization. J. Biol. Chem. 1995;
270: 6456-6463.
- Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumo, K., Kawasaki,
T. Absorption of Val-Tyr with in vitro angiotensin I-converting
enzyme inhibitory activity into the circulating blood system of
mild hypertensive subjects. Biol. Pharm. Bull. 2002; 25:
1228-1230.
- Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are
present in aorta after oral administration of sour milk containing

- these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 1996; 126: 3063–3068.
- Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K., Shimizu, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1993; 57: 695-697.
- Meisel, H., Schlimme, E. Inhibitors of angiotensin converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins). β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. VCH-Weinheim 1994; 27-33.
- Miyamoto, K., Shiraga, T., Morita, K., Yamamoto, H., Haga, H., Taketani, Y., Tamai, I., Sai, Y., Tsuji, A., Takeda, E. Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; 1305: 34-38.
- Morita, A., Chung, YC., Freeman, HJ., Erickson, RH., Sleisenger, MH., Kim, YS. Intestinal assimilation of a proline-containing tetrapeptide. Role of a brush border membrane postproline dipeptidyl aminopeptidase IV. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 610-616.
- Mullally, MM., Meisel, H. FitzGerald, RJ. Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1996; 377: 259-260.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 1995a; 78: 777–783.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy. Sci.* 1995b; 78: 1253–1257.

- Ondetti, MA., Rubin, B., Cushman, DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196: 441-444.
- Rival, SG., Carmen GB., Wichers HJ. Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxxygenase Inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 295-302.
- Satake M, Enjoh M, Nakamura Y, Takano T, Kawamura Y, Arai S, Shimizu M. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2002; 66: 378-384.
- Shimizu, M., Tsunogai, M., Arai, S. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides*. 1997; 18: 681-687.
- Sun, H., Liu, D., Li, S., Qin, Z. Transepithelial transport characteristics of the antihypertensive peptide, Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009; 73: 293-298.
- Vermeirssen, V., Deplancke, B., Tappenden, KA., Van Camp, J., Gaskins, HR., Verstraete. W. Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer. *J. Pept. Sci.* 2002; 8: 95-100.
- 環境省 動物の愛護及び管理に関する法律. 1973.
<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S48/S48HO105.html>
 (accessed 1.4.2014)
- 千葉英雄. 食品タンパク質に由来する生理活性ペプチド. *化学と生物* 1991; 29: 454-458.
- 藤田裕之, 安本 良一, 吉川 正明. かつお節サーモライシン消化物由来のプロドラッグ型アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド LKPNM の血圧降下特性. *日本農藝化学會誌*, 1996; 70: 13.
- 松井利郎 7S グロブリンからの血圧降下ペプチド SVY の高度生成とその生理機能評価. *大豆たん白研究* 2003; 6: 73-77.

吉川正明．食品の生体調節機能と *in vitro* バイオアッセイ．化学と生物
1993; 31: 342-346.

第 4 章 発酵乳からの血圧降下ペプチドの単離同定

4-1. 緒言

レニン・アンジオテンシン系におけるキー酵素である ACE は、主に肺や血管内皮細胞に存在し、アンジオテンシン I に作用して、血管壁平滑筋収縮作用を有するペプチドであるアンジオテンシン II を産生させることで、強い血圧上昇作用を生じさせる [Skeggs, 1956]。更に、ACE は降圧作用を有するブラジキニンを分解して、不活性化することでも血圧を上昇させる [Erdoş, 1975]。従って、この ACE の酵素活性を阻害する物質が、血圧上昇を抑える作用があると考えられ、蛇毒由来のペプチドを参考にカプトプリルのような医薬品が開発された。しかし、このような化学合成物は、効果は高いが、常に安全性の問題を考慮しなければならない。一方で、天然物由来の ACE 阻害ペプチドは、合成物よりも安全性が高いことが期待される。しかし、*in vivo* では血圧降下作用を示さない ACE 阻害ペプチドも報告されている [Fujita, 1999] ために、真の血圧降下ペプチドを見出すためには、高血圧モデルラットである SHR への試験などの併用により、有効性を検証する必要がある。

L. helveticus 発酵乳の ACE 阻害活性は、対数増殖期後期から急激に増加し、発酵 20 時間以降で最大値となる。ACE 阻害活性を持つ血圧降下ペプチドである、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、その ACE 阻害活性を指標に見出された [Nakamura, 1995a]。しかし、この発酵乳は酸味が強く、加糖などの風味調整無しでは飲用しにくいことが課題であった。一方で、*L. helveticus* の発酵を 10 時間程度で停止させて、酸味が穏やかなヨーグルト様状態にした場合は、ACE 阻害活性が弱いにも関わらず、SHR に経口投与すると、顕著な血圧降下作用が報告された [Yamamoto, 1994b]。この発酵乳ホエーを逆相 HPLC で分析して、ペプチド類の溶出パターンを調べたところ、*L. helveticus* CP790 株の菌体外プロテアーゼでカゼインを直接分解したペプチド混合物を逆相 HPLC で分析した場合の溶出パターンと類似していた [Yamamoto, 1994]。一方、風味調製を行わなくても直接摂取可能な、嗜好性に優れたヨーグルトタイプの発酵乳

開発を目標として、*L. helveticus* CP790 株から、酸生成力の弱い変異株である *L. helveticus* CPN4 株が分離された[Yamamoto, 1996]。*L. helveticus* CPN4 株は、親株である *L. helveticus* CP790 株より乳酸生成力が弱いのが特徴であり、発酵を乳酸の生成量が少ない初期段階で停止しても、低温保存時の酸度上昇が抑制されるために、酸味がマイルドな製品の提供が期待できる。この *L. helveticus* CPN4 株を用い、発酵初期段階である pH 4 付近で停止させて一般的なヨーグルトと同等の酸味に改良した発酵乳は、高血圧モデルラットである SHR に経口投与することで、血圧降下作用が確認された[Yamamoto, 1996]。しかし、本ヨーグルト様発酵乳の ACE 阻害活性は低く、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は検出されなていない。

そこで、このヨーグルト様発酵乳中に含まれる血圧降下作用を示す有効成分は、2 章で同定された Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の可能性が考えられた。しかし、逆相 HPLC を用いて Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の含有量を測定したところ、本ペプチドは検出されたものの、血圧降下作用を発揮するために必要な有効量は含まれていなかった。従って、本ヨーグルト様発酵乳の血圧降下作用には、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln や、Ile-Pro-Pro、Val-Pro-Pro 以外の新たな成分が関与している可能性が示された。

本研究では、*L. helveticus* CP790 株から派生した酸生成力の弱い変異株 *L. helveticus* CPN4 株を用い、発酵初期段階である pH4 付近で止めて一般的なヨーグルトと同等の酸味に改良した発酵乳から、SHR への経口投与による血圧降下作用を指標に活性成分の単離同定を行った。その結果、顕著な血圧降下作用を持つ新規ペプチド Tyr-Pro を見出した。また、Tyr-Pro は ACE 阻害活性が非常に弱いことから、血圧降下作用発揮には別のメカニズムがある可能性が推察された。

4-2. 材料と実験方法

4-2-1. 試薬と微生物

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu)、ACE、カゼインはシグマ社から購入した。脱脂粉乳は四つ葉乳業製を使用した。ペプチド合成用試薬は島津製作所より購入した。その他の試薬は、特級以上のものを用いた。発酵乳作製には、*L. helveticus* CP790 株を親株として分離した酸生成の弱い変異体 *L. helveticus* CPN4 株[Yamamoto, 1996]を使用した。

4-2-2. 発酵乳ホエーの調製

L. helveticus CPN4 株を、達温殺菌した 9%還元脱脂粉乳 100 ml に接種し、37℃で培養した。そして、pH4.2 に達した時点で発酵を終了して冷却した。得られた発酵乳は、攪拌均質化後に 20000 × g で 10 分間遠心分離を行ない、培養上清(ホエー)を回収した。

4-2-3. ラットの血圧測定方法

血圧測定には、高血圧モデルラットである SHR の雄を日本チャールズリバー社より購入して用いた。実験動物用飼料は、日本クレア社製の CE-2 を与え、飲用水とともに自由摂取とした。飼育環境は、温度 24 ± 1℃、湿度 55 ± 5%で、12 時間の明暗サイクル（明期 8:00-20:00）とした。血圧測定には、18～21 週齢、体重 300～330 g の SHR を 1 群 5 匹で使用し、飲用水は自由摂取の状態で、試験サンプルの投与 12 時間前から投与後 10 時間まで断餌を行った。SHR の血圧測定は、次の方法に従って行った。すなわち、ペプチド混合物および、ペプチドは、胃ゾンデを用いて強制的に経口投与し、45℃で 5 分間保温した後、非観血式血圧測定装置(「PE-300」、ナルコバイオシステムズ)を用い、tail-cuff 法で収縮期血

圧値を求めた。コントロール群には、0.01 M リン酸を含む生理食塩水 (PBS; pH 7.4) にカゼインを 0.05% になるように添加した溶液 (PBS-カゼイン溶液) を、試料群には PBS-カゼイン溶液にペプチドを溶解した液を投与した。PBS に溶解した合成ペプチドも同様に測定した。コントロール群とサンプル群の群間比較のための統計解析は、Student's t-test を用いた。本実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」[環境省, 1973] を遵守して実施した。

4-2-4. ACE 阻害活性の測定方法

ACE 阻害活性は、既知の方法 [Cushman; 1971] に従って行った。すなわち、ペプチドを含む溶液 80 μ l を Hip-His-Leu を含むホウ酸緩衝液 (3.8 mM Hip-His-Leu、0.1M ホウ酸、0.3M NaCl; pH 8.3) 200 μ l に添加し、37°C で 5 分間保温した後に、2 ミリユニットの ACE を添加した。さらに 37°C で 30 分間保温した後に、250 μ l の 1 規定 HCl を添加して酵素反応を停止した。1 ユニットの ACE は、37°C、pH8.3 の条件で、1 分間に Hip-His-Leu から 1 M のヒプリル酸を遊離する活性であると定義されている。遊離したヒプリル酸は、酢酸エチルで抽出した後に 120°C で乾固して溶媒を除去した。溶媒除去後に蒸留水 1 ml を加え、抽出されたヒプリル酸の 228 nm における吸光度を測定し、これを ACE 阻害活性とした。ACE 阻害活性は下記式より算出した。

$$\text{ACE 阻害率} = [(A-B) / (A-C)] \times 100(\%)$$

A : 試料を含まない場合の 228 nm の吸光度

B : 試料を添加した場合の 228 nm の吸光度

C : 酵素及び試料を添加しない場合の 228 nm の吸光度

ACE の酵素活性を 50% 阻害するために必要な試料の濃度 (μ M) を IC₅₀ とした。

4-2-5. 固相カラムおよび逆相 HPLC を使用した血圧降下ペプチドの精製

L. helveticus CPN4 株 のヨーグルト様発酵乳のホエー画分は、10 個の Sep-pak C-18 カートリッジカラム(ウオーターズ)を用いて粗分画した。すなわち、異なる濃度のアセトニトリル溶液を準備し、バッチ方式にて溶出させた。最初に、ホエー溶液を 10 ml ずつ、Sep-pak C-18 カラムに吸着させた後、0、10、15、20、30、50%アセトニトリル(0.1%トリフルオロ酢酸を含む)を用いて段階的に溶出させた。溶出物は濃度別に 10 本分をまとめ、乾固させて、6 つの粗画分とした。それらを 40 ml の PBS に溶解した後、SHR の 1 匹当たり 1 ml ずつ経口投与して 6 時間後の降圧値を測定した。血圧降下作用が得られた画分の残りを、逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフ(HPLC)により分析した。HPLC は、日立製作所製のモデル L4000、L6000 そして L6200 を使い、分析カラムは、日本ミリポア社製の μ -Bondasphare C-18 カラム($\phi 3.9 \times 150$ mm)を使用した。溶出は、流速 1.0 ml/min にて、溶液 A(0.1%トリフルオロ酢酸- H_2O)から、60 分後に 40%の溶液 B(0.1%トリフルオロ酢酸-100%アセトニトリル)になる直線濃度勾配にて行った(溶出条件 1)。ペプチドの検出は、215 nm で行った。最も血圧降下作用の高かった画分は、再度、逆相 HPLC で分画した。溶出は、流速 1.0 ml/min にて、上述の溶液 A と B を用いて、アセトニトリル濃度を 5%から開始し、60 分後に 20%になる穏やかな濃度勾配の条件で実施した(溶出条件 2)。

4-2-6. 血圧降下ペプチドの定量分析

本ヨーグルト様発酵乳に含まれる Tyr-Pro ペプチドは、逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフ(HPLC)により分析した。分析カラムは、 μ -Bondasphare C-18(日本ミリポア)を用いて、100 μ l のホエーサンプルを分析した。逆相 HPLC の分析における溶出条件は、アセトニトリル濃度を 5%から始めて 60 分後に 20%になる緩やかな濃度勾配(溶出条件 2)の条件で実施した。ペプチドの定量は、合成した Tyr-Pro ペプチドをスタンダードとして検量線を作成することで実施した。

4-2-7. 血圧降下ペプチドの同定と化学合成

精製したペプチドのアミノ酸配列分析は、タンパク質一次構造分析装置 PPSQ-10(島津製作所)を使用して行った。ペプチドの化学合成は、ペプチド合成機 PPSM-8(島津製作所)を使用して行った。すなわち、固相担体としてベンジルオキシベンジルアルコールタイプのポリスチレン樹脂を用い、アミノ基をフルオレニルメトキシカルボニル基(Fmoc)で保護されたプロリンが結合した樹脂 20 μmol を使用した。目的のアミノ酸配列に従って、アミノ基が Fmoc 基で保護された Fmoc-チロシンを 100 μmol 反応させてペプチド結合樹脂を得た。次にこのペプチド結合樹脂を 1 ml の反応液(1%エタンジチオール、5%アニソールを含むトリフルオロ酢酸)に懸濁し、室温で 2 時間反応させてペプチドを樹脂から切り離し、同時に側鎖保護基を外した。次に反応混合液をガラスフィルターで濾過した後、無水エーテル 10 ml を加えて、生成したペプチドを沈澱させ、3000 回転、5 分間遠心して分離した。その沈澱を無水エーテルにて数回洗浄した後、窒素ガスを吹き付けて乾燥した。このようにして得られた未精製の合成ペプチドを 0.1 規定の HCl 水溶液 2 ml に溶解した。その後全量を C18 の逆相カラムを用いた HPLC を用いて前節の溶出条件 1 の条件で精製した。

精製したペプチドは、さらに、6 規定の HCl で 20 時間加水分解したあとにアミノ酸組成分析装置(型式 800 シリーズ、日本分光)で分析して、設計通りのアミノ酸組成であるかどうかを確認した。

4-3. 結果

4-3-1. 発酵乳ホエーからの血圧降下フラクションの限定

血圧降下ペプチドを単離するために、120 ml のヨーグルト様ペプチドを、Sep-pack カートリジカラムを用いて、6 つのフラクションに分け、乾燥後にそれぞれ 40 ml ずつ PBS に溶解させた。それぞれのフラクションを 1 匹の SHR に対して 1 ml ずつ経口投与して、コントロール群との血圧降下値を比較したところ、フラクション 1 と 2、および 5 に有意な血圧降下作用が得られた(表 4-1)。特に、フラクション 2(投与量は 1 ml / 匹)は、分画前のホエー(投与量は 3 ml / 匹で、フラクション 2 の溶液 1 ml に相当する)の血圧降下値と同様の値を得た。続いて、逆相・HPLC を用いて、フラクション 2 の残りをさらに 4 つのフラクションに再分画した (図 4-1-A)。

分取したそれぞれのフラクションを乾燥後に 35 ml の PBS に溶解させ、1 ml ずつ SHR に投与して血圧降下作用を評価した。その結果、コントロール群と比較して、フラクション 2-1、2-2 に有意な血圧降下作用が得られた(図 4-1-B)。次に、最も強い降圧作用が得られたフラクション 2-2 のサンプルの残りをを用いて、溶出条件 2 と同様の条件で逆相 HPLC を用いて分画し、5 つの主要ピークを得た(図 4-2-A)。そして各ピークを分取後に 30 ml の PBS に溶解させ、1 ml ずつ SHR に投与して血圧降下作用を測定した(図 4-2-B)。

その結果、コントロール群と比較して、フラクション 2-2-2 と 2-2-3 に有意な血圧降下作用が得られた(図 4-2-B)。特に、フラクション 2-2-3 の血圧降下値は、Sep-Pak カートリッジによる分画前の Prefractionated フラクションの血圧降下値 (表 4-1) とほぼ同様の値であった。

4-3-2. 血圧降下ペプチドの同定と ACE 阻害活性

血圧降下作用を示したフラクション 2-2-2 に含まれる血圧降下ペプチドを同定するために、逆相 HPLC で精製した(4-2-5 節に記載の溶出条件

2 を使用)。画分 2-2-2 から精製したペプチドを、N 末端アミノ酸配列および、アミノ酸組成分析により同定した。その結果、本ペプチドの配列は Tyr-Pro で、アミノ酸組成は、Tyr:Pro = 1 : 0.98 であった。この配列は、 α_{s1} カゼイン(146-147)、 β カゼイン(114-115)、そして κ カゼイン(58-59)から見つかった。この Tyr-Pro ペプチドは、これまでの ACE 阻害ペプチドで報告されている阻害活性と比較すると弱かった(IC_{50} = 720 μ M)。

4-3-3. SHR に経口投与したときの血圧降下作用

Tyr-Pro ペプチドの血圧降下作用の経時変化を調べた。すなわち、合成したペプチド Tyr-Pro を SHR の体重 1 kg あたり 1.0 mg を経口投与して、投与後 0、2、4、6、8 そして、24 時間後の血圧降下値を測定した。その結果、コントロール群は、24 時間に渡り血圧値の変化は得られなかったが、Tyr-Pro を投与した群は、コントロール群と比較して投与後 4、6、8 時間後に有意な血圧降下作用を示した(それぞれの降圧値は -23.2 ± 6.7 、 -27.4 ± 7.1 、 -19.4 ± 2.9 mmHg)。その後、緩やかに血圧が元に戻り始め、投与 24 時間後には有意な差は得られなかった(-4.8 ± 4.8 mmHg)

次に、合成したペプチド Tyr-Pro を SHR に様々な量で経口投与し、6 時間後の血圧降下作用を比較した(図 4-3)。Tyr-Pro ペプチドは、SHR の体重 1 kg あたり、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 mg を投与し、投与前の収縮期血圧値からの降下値を計測した。その結果、Tyr-Pro を SHR の体重 1 kg あたり、0.1 から 10 mg の投与で、有意な降圧作用が得られた。

4-3-4. 発酵中の血圧降下ペプチドの生成量

Tyr-Pro は、逆相 HPLC を用いて、前節 4-2-5. の条件 2 で分析すると 19.5 分に溶出することが確認された。Tyr-Pro の含有量は、そのピークの高さを計測することで定量した。*L. helveticus* N4 株の発酵乳においては、Tyr-Pro 生成量の経時変化を測定した。その結果、発酵が進むにつれて、pH が低下し、かつ Tyr-Pro の生成量も増加した(図 4-4)。発酵 10 時間後の Tyr-Pro 含有量は、約 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であり、pH 4.3 で発酵を停止させたヨーグルト状態の発酵乳ホエーでの含有量は約 8.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であった。

表 4-1 Sep-Pak カートリッジによる分画物の血圧降下活性

Fraction	Concentration of CH ₃ CN(%)	Systolic blood pressure ¹ (mmHg \pm SEM)
Prefractionated		-29.6 \pm 9.5 ***
1	0	-9.6 \pm 5.7 *
2	0-10	-22.3 \pm 3.2 ***
3	10-15	-8.1 \pm 2.6
4	15-20	1.0 \pm 6.3
5	20-30	-8.8 \pm 8.5 *
6	30-50	-7.6 \pm 5.3
Control		1.9 \pm 8.1

¹Mean of five determinations.

Different from the control (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

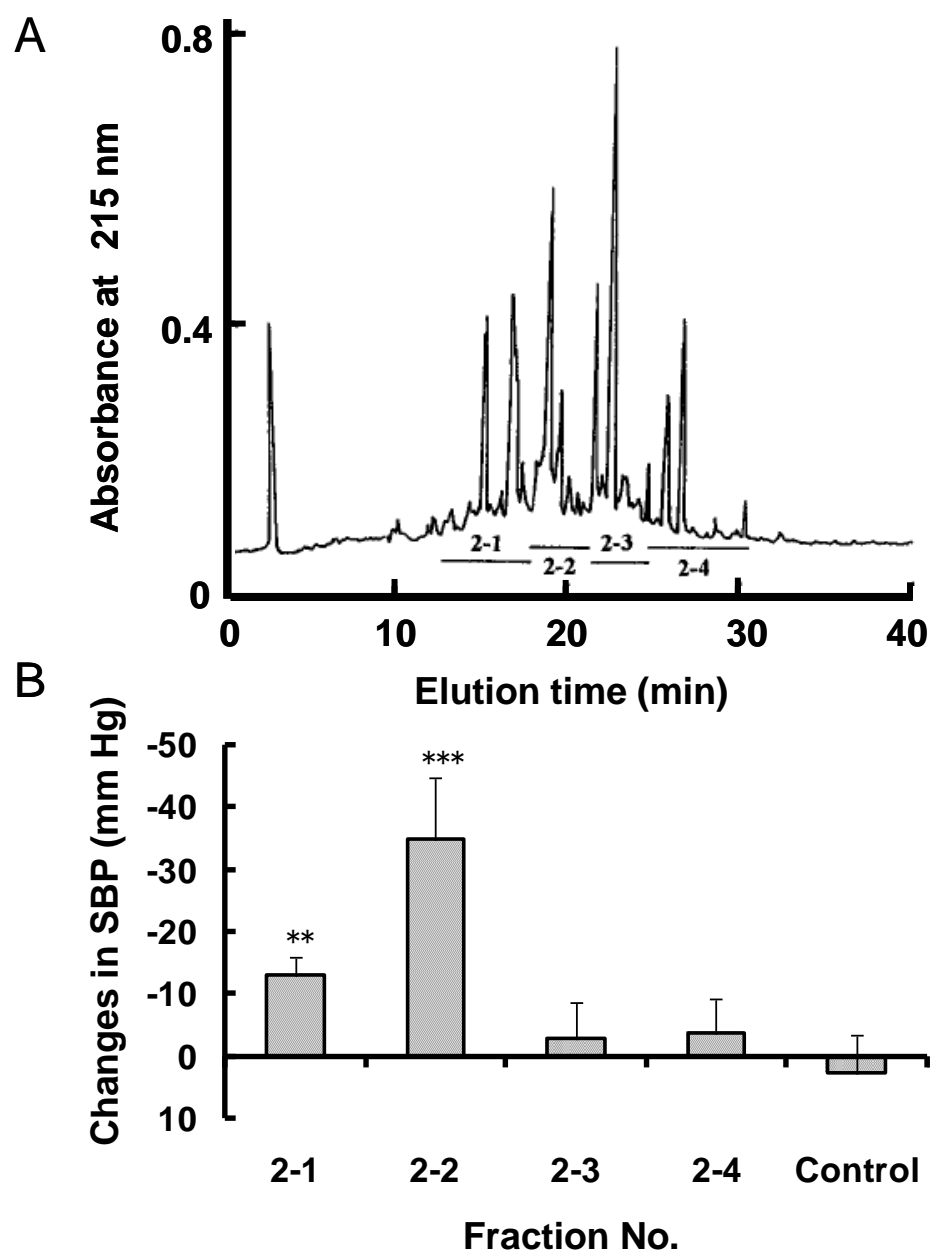


図 4-1 ヨーグルトホエーからの血圧降下フラクションの限定

A)逆相 HPLC での溶出パターン

フラクション 2 を 4 つのフラクションに分けた。

B)サブフラクションの血圧降下作用

各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。サブフラクション 2-1、2-2 投与群は、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用を示した (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

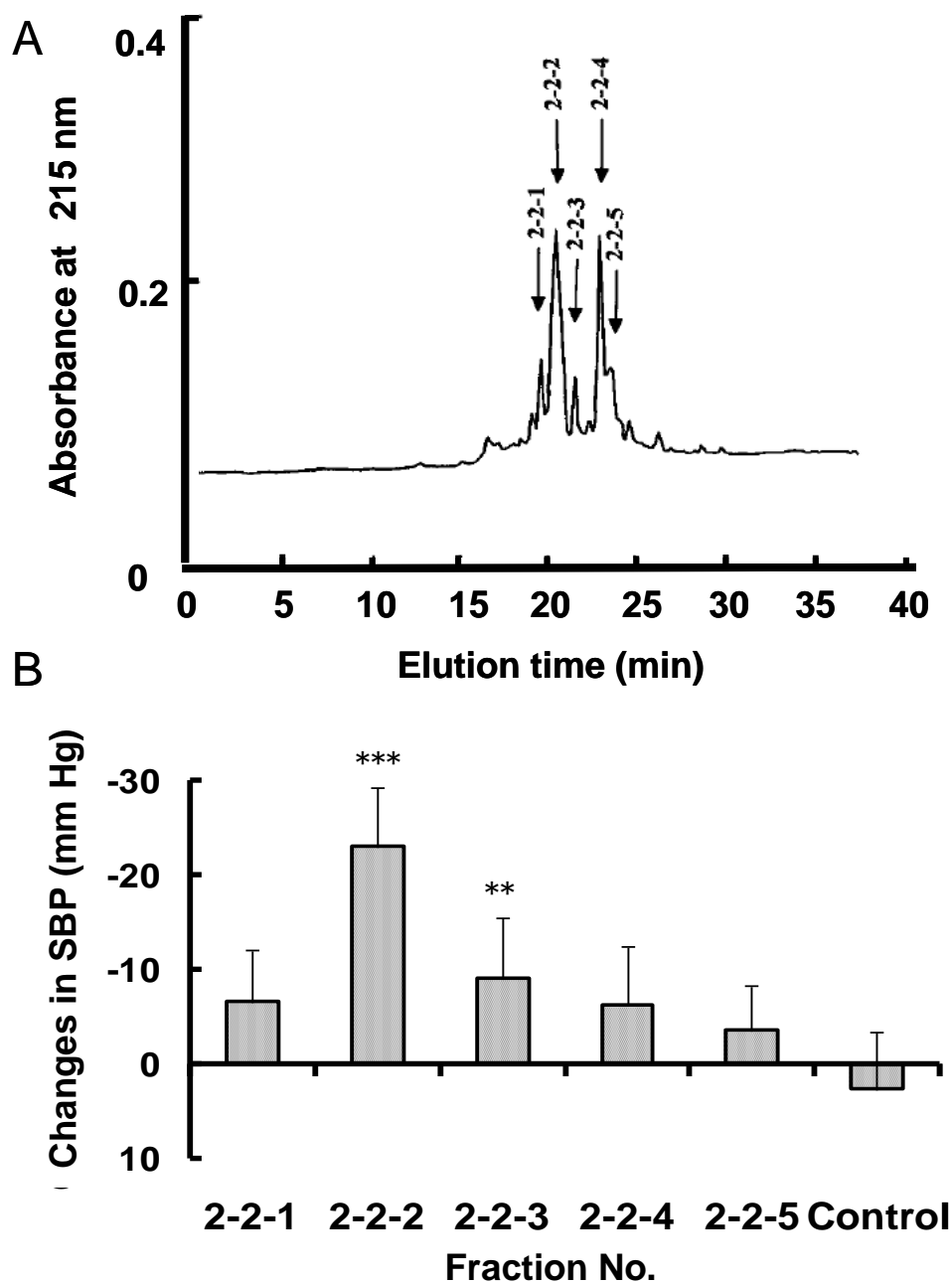


図 4-2 活性フラクションからの血圧降下ペプチドの精製

A) 逆相 HPLC での溶出パターン

活性フラクション 2 を 5 つのサブフラクションに分けた。

B) 各サブフラクションの血圧降下作用

各値は、5 匹の SHR の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。サブフラクション 2-2-2 および 2-2-3 投与群は、コントロール群と比較して有意な血圧降下作用を示した

(** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)。

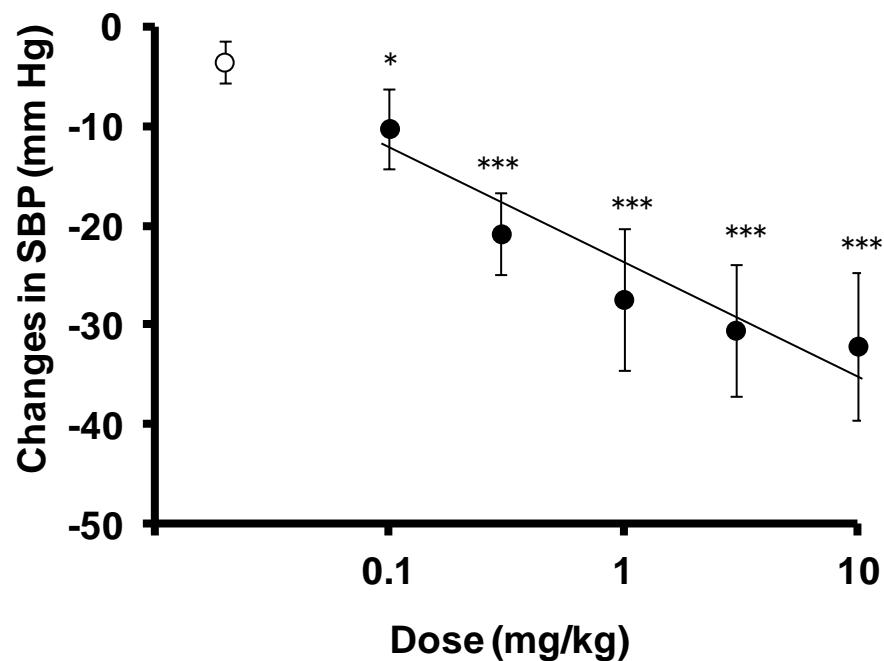


図 4-3 血圧降下ペプチドの投与量と血圧降下値の関係

ペプチド Tyr-Pro を、SHR に経口投与し、6 時間後の血圧降下値を測定した。各値は、5 匹の血圧降下値の平均値 \pm SEM で示した。コントロール群(○)は、0.05%のカゼインを含む PBS を投与し、ペプチド群(●)は、SHR の体重 1 kg あたり 0.1~10 mg の Tyr-Pro を投与した。その結果、コントロール群と比較して、0.1 から 10.0 mg 投与にて、有意な血圧降下作用を示した(* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)。

(特許第 3364579 号で使用済)

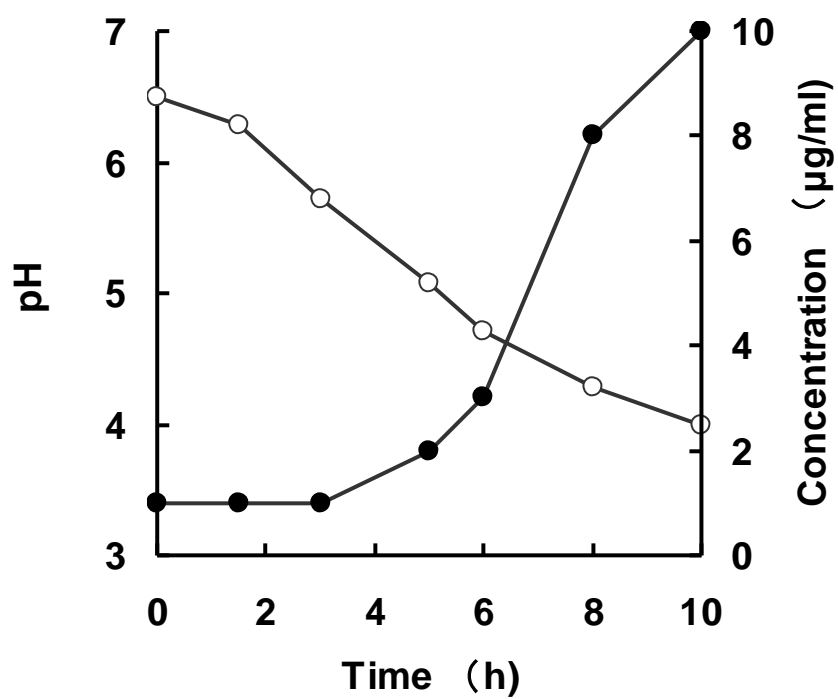


図 4-4 *L.helveticus* CPN4 株における、発酵段階別の Tyr-Pro(●)の生成量と、pH 低下(○)の経時変化

4-4. 考察

この研究において、今まで不明であった、*L. helveticus* CPN4株のヨーグルト様発酵乳に含まれる血圧降下作用を示す主要な成分が、ペプチド Tyr-Pro であることが明らかになった。Tyr-Pro は、すでに酒や酒かすから血圧降下ペプチドとして報告されている [Saito, 1994] が、発酵乳からの分離は、今回が初めてである。そこで、Tyr-Pro について詳細な血圧降下作用を調べた。

L. helveticus CPN4株のヨーグルト様発酵乳のホエー(ホエー)は、1匹の SHR あたり 3 ml 投与することで、強い血圧降下作用 (-29.6 ± 9.5 mmHg) を示した (表 4-1)。ホエー 3 ml を SHR に経口投与したときに得られる血圧降下作用は、Tyr-Pro ペプチドの定量値から推察すると、Tyr-Pro ペプチドを SHR の体重 1 kg あたり 0.1 mg 経口投与した時の血圧降下作用に相当すると考えられた。しかし、SHR の体重 1 kg あたり 0.1 mg の Tyr-Pro ペプチドを経口投与したときの血圧降下作用は -10.5 mmHg であり、3 ml のホエーを SHR に投与したときの血圧降下作用 (-29.6 mmHg) と比較すると弱いことが明らかになった (図 4-4)。本研究において、Tyr-Pro ペプチドは、フラクション 2-2-2 から血圧降下作用を発揮する主要ペプチドとして見出された。しかし、その他のフラクションにおいても、SHR への経口投与で有意な血圧降下作用が示されていることから、それらの中にも、他のマイナーな血圧降下ペプチド(群)が存在する可能性が高いと考えられた。

以前の研究において、*L. helveticus* を主要菌として含むスターターを利用して 24 時間発酵した発酵乳から、2 種類の血圧降下ペプチド Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro が分離されている [Nakamura, 1995a]。これらペプチドは、非常に強い ACE 阻害活性を持ち、発酵中に生成されてくることが判っている。しかし、本研究で用いたヨーグルト様発酵乳 (pH 4.3 付近) は、ACE 阻害活性はほとんど確認されなかったことから、Ile-Pro-Pro や Val-Pro-Pro の血圧降下ペプチドは含まれないことが示された。

Ile-Pro-Pro や Val-Pro-Pro の配列は、牛乳カゼイン中において、3 箇所存在する。すなわち、 β カゼインの 74-76 番目と 84-86 番目、 κ カゼインの 108-110 番目である。一方、Tyr-Pro のアミノ酸配列は、カゼ

インの C 末端付近に位置する(α_{s1} カゼイン(146-147、159-160)、 β カゼイン(114-115)、そして κ カゼイン(58-59))。 *L. helveticus* CP790 株のプロテアーゼは、カゼインの C 末端付近を好んで分解することが判っている[Yamamoto, 1997]ことから、Tyr-Pro ペプチドは、ヨーグルト様状態の発酵初期において、*L. helveticus* のタンパク質分解システムによって、容易に遊離してくると考えられた。

多くの ACE 阻害ペプチドは、乳タンパク質[Karaki, 1990; Maruyama, 1987a, 1987b, 1985]をはじめ、トウモロコシ[Maruyama, 1989]、鰹節[Matsumura, 1993; Yokoyama, 1992]など様々な食品タンパク質から見出されている。しかし、ペプチドの ACE 阻害活性と、SHR における血圧降下作用は、必ずしも相関しない。Tyr-Pro ペプチドの ACE 阻害活性(IC_{50})は、720 μ M であり、報告済みの Val-Pro-Pro($IC_{50} = 9 \mu$ M)と Ile-Pro-Pro($IC_{50} = 5 \mu$ M)と比較しても、その阻害活性は非常に弱い。しかし、SHR への経口投与試験において、Tyr-Pro は、作用メカニズムは不明であるが、ACE 阻害作用を持つペプチドである、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro および、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro と比較して、ほぼ同様な強い血圧降下作用を発揮した。ACE 阻害以外の血圧降下メカニズムとしては、 γ -アミノ酪酸(GABA)のように腸管から吸収されて交感神経を抑制することで血圧低下作用を示す例が知られている[Fujimura, 1999]。Tyr-Pro においては、別の研究において、ラットへの経口投与で交感神経系の抑制作用が見出されているが[内田, 2012]、血圧降下作用との関係は不明である。また、イワシタンパク質由来の Var-Tyr は、血圧降下作用を持つ ACE 阻害ペプチド($IC_{50} = 26.0 \mu$ M)として見出されたが、それ以外の作用メカニズムとして、L 型カルシウムチャネルをブロックすることにより、細胞外からのカルシウム流入を抑制する作用があることが明らかになった[Matsui, 2005]。この研究成果は、血圧降下作用を持つペプチドが、複数の作用メカニズムによって、効果を発揮している可能性を示唆するものである。従って、Tyr-Pro においても、複数の作用メカニズムを想定して作用機序を詳細に調べることで、今後の Tyr-Pro の血圧降下メカニズム解明に重要であると考えられる。また近年は、本研究のような対照群と複数サンプル群の差を検出する最適な統計方法として、分散分析後に、Dunnett 検定などの多重比較検定が推奨されている。今後の研

究には、実験精度の向上に加えて、より最適な統計手法を選定していく必要があると考える。

*L. helveticus*を含むスターターで24時間発酵させた発酵乳について、高血圧患者に対する飲用試験が行われた[Hata, 1996]。その結果、高血圧患者がこの発酵乳を1日あたり95 mlずつ8週間飲用することで、血圧値が有意に低下(-14.1 ± 3.1 mmHg)した。SHRにおいては、この *L. helveticus* 発酵乳を1匹あたり5 mlの投与で収縮期血圧が-25 mmHg低下したが、本研究でもこのヨーグルト様発酵乳をSHRに1匹あたり3 ml投与することで、 -29.6 ± 9.5 mmHg低下した。したがって、本ヨーグルト様発酵乳は、動物実験レベルでは、ほぼ同レベルの血圧降下作用を示すことが示された。そこで、高血圧患者および、高血圧予防に向けた機能性食品としての可能性があることが示唆され、今後のヒトでの検証が期待される。

4-5.参考文献

- Cushman, DW., Cheung, HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 1971; 20: 1637-1648.
- Erdo EG. Angiotensin-I converting enzyme. *Circulation Research* 1975; 36: 247-255.
- Fujita, H., Yoshikawa, M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* 1999; 44: 123-127.
- Fujimura, S., Shimakage, H., Tanioka, H., Yoshida, M., Suzuki-Kusaba, M., Hira, H., Satoh, S. Effects of GABA on noradrenaline release and vasoconstriction induced by renal nerve stimulation in isolated perfused rat kidney. *Br J Pharmacol.* 1999; 127: 109-114.
- Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., Takano, T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 64: 767-771.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U., Takemoto, S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 1990; 96: 367-371.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Suzuki, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α s1-casein. *Agric. Biol. Chem.* 1987a; 51: 2557-2561.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N., Suzuki, H. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.* 1987b; 51: 1581-1586.
- Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T., Tanaka, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides

- related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Biol. Chem.* 1989; 53: 1077-1081.
- Maruyama, S., Nakagome, K., Tomizuka, N., Suzuki, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. 11. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 1985; 49: 1405-1409.
- Matsui, T., Ueno, T., Tanaka, M., Oka, H., Miyamoto, T., Osajima, K., Matsumoto, K. Antiproliferative Action of an Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide, Val-Tyr, via an L-Type Ca^{2+} Channel Inhibition in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension Research* 2005; 28: 545-552.
- Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K., Shimizu, T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1993; 57: 695-697.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* 1995a; 78: 777-783.
- Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy. Sci.* 1995b; 78: 1253-1257.
- Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., Imayasu, S. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994; 58: 1767-1771.
- Skeggs, LT., Kahn JE., Shumway, NP. The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 1956; 103: 295-299.

- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Purification and specificity of a cell-wall-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Biochem. 1993; 114: 740-745.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano T. Antihypertensive effect of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 1994a; 58: 776-778.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. J. Dairy Sci. 1994b; 77: 917-922.
- Yamamoto, N., Masujima, Y., Takano, T. Reduction of membrane-bound ATPase activity in a *Lactobacillus helveticus* strain with slower growth at low pH. FEMS Microbiol. Lett. 1996; 138: 179-184.
- Yamamoto, N., Antihypertensive peptides derived from food proteins. Biopolymers. 1997; 43: 129-134.
- 内田直人,大澤一仁,大木浩司,中村康則,永井克也. *Lactobacillus helveticus* 発酵乳由来ジペプチド Tyr-Pro の抗不安作用. 日本食品科学工学会第 59 回大会 講演集. 2012; 164.
- 環境省 動物の愛護及び管理に関する法律. 1973.
<http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S48/S48HO105.html>
 (accessed 1.4.2014)

第 5 章 *L. helveticus* 発酵乳の安全性評価

5-1. 緒言

人類による発酵乳利用の歴史は古く、その始まりは紀元前 5000 年頃といわれている。発酵乳が生まれたきっかけは、乳を木桶や皮袋の容器に入れて保存した際に、それらの容器に付着していた乳酸菌の自然発酵で生じたと考えられている[森, 2007]。乳酸菌は、乳酸を生成するために、乳の pH を低下させ、腐敗菌の増殖を抑えることで、貴重な食料である乳の保存性を高めることができる。さらに、発酵により独特の風味が付与されることで、嗜好性も向上し、牧畜文化の広がりとともに世界中に広がっていった[久住, 2013]。

発酵乳の生理機能が注目されたのは、20 世紀初頭になってからである。ロシア出身の免疫学者であるパスツール研究所のメチニコフ(1845-1916)が、自身の著書“The prolongation of life”のなかで、発酵乳摂取が健康に良いことが提唱され[Mechnikoff, 1908]、以降、そのことがきっかけで、発酵乳や乳酸菌の生理機能の研究が世界中で活発化した[高野, 1996]。

近年の研究において、*L. helveticus* を主要菌とするスターターで 24 時間発酵させた発酵乳は、2 種類の ACE 阻害ペプチド Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含有し、高血圧患者および、正常高値血圧者の血圧値を有意に低下させる作用が示された[Hata, 1996; 中村, 2004]。この発酵乳は、血圧降下ペプチドをはじめ、様々なペプチド成分を含む機能性に優れた食品素材であるが、発酵で生じた乳酸が強い酸味を呈するために、風味調整無しで直接飲用するのが困難であった。また、物性が液体のために汎用性に乏しく、用途が飲用に限定されていた。

そこで、これら課題の解決のために、乳酸を低減して粉末化した素材が開発された[Aihara, 2005]。しかし、発酵乳の体積が減ったことで、原料由来の血圧降下ペプチドをはじめとする、様々な発酵成分が濃縮されたため、過剰摂取時の安全性を新たに考慮する必要性が生じた。

食品の安全性は、一般的には、長年の食経験から担保されている。しかし、特定保健用食品や栄養機能食品のように、健康効果を期待して摂取する場合には、関与成分の量や食品加工度から考えて、十分な食経験が無いか、または乏しいと判断される場合は、*in vitro* 及び、動物を用いた *in vivo* 試験により、ヒトへ投与する前に安全性を評価する必要がある [内閣府 食品安全委員会, 2004, 2007]。

L. helveticus を含むスターターで発酵させた発酵乳は、日本国内においては、90 年以上の摂取経験がある。さらに、動物試験においても安全性が評価されており、*L. helveticus* で 24 時間発酵させた発酵乳を 2.5% 含む飼料を、SHR ラットに 7 週齢から 23 週齢まで自由摂取させた結果、対照(基礎飼料)群との間で飼料摂取量や体重変化に差はなかった。そして、本発酵乳摂取群では、比較群より有意に血圧値が低かったが、剖検の結果、臓器重量、血液成分に差は無かった [Nakamura, 1996]。さらに、この *L. helveticus* で 24 時間発酵させた発酵乳を、正常血圧値を示す Wistar-Kyoto ラット(WKY)へ、体重 1 kg あたり 25 ml を単回経口投与したが、WKY ラットの血圧には、大きな変化を与えなかった [Nakamura 1995]。一方で、*L. helveticus* で 24 時間発酵させた発酵乳を、ICR マウス(雌)へ 4 週齢から終生投与した結果、対照群より平均寿命が有意に 8% 延長した。剖検の結果腫瘍、腎障害、感染症などの遅延が示唆された [荒井, 1980] ことから、この *L. helveticus* 発酵乳は安全性が高いのみならず、健康への有用作用があることも示された。

L. helveticus で 24 時間発酵させた発酵乳のヒト摂取における安全性については、健康な成人への過剰摂取および血圧への影響や、高血圧患者での飲用評価が行われ、いずれも問題ないことが示されていた。すなわち、健康な成人ボランティア 60 名を対象にした試験では、*L. helveticus* 発酵乳を一度に大量摂取したときの影響が調べられ、体重 60 kg 当たり *L. helveticus* 発酵乳 100 ml を基準とし、その 1~5 倍量の 5 段階の用量を、また対照として未発酵乳を用いて同様に 5 段階を設定して飲用したが、両群で、胃腸症状に有意な差はなかった。また、検出した胃腸症状は一過性で、治療を要するものではなかった [中島, 1996]。次に、正常血圧者 26 名を対象に、*L. helveticus* 発酵乳の血圧、心拍数、血液成分、自他覚症状に与える影響が調べられた。被験者は、*L. helveticus* 発酵乳

95ml(Val-Pro-Pro 1.5 mg、Ile-Pro-Pro 1.1 mg 含有)を毎日 8 週間、飲用させた群とプラセボ飲料を同様に飲用させた群の 2 群で評価した。その結果、両群ともに、血圧、心拍数、体重、血液成分を含め測定したいずれの指標にも大きな変化はなかった[板倉, 2001]。次に、軽症高血圧患者(高血圧ガイドライン 2009 ではⅠ度高血圧に相当する)および中等症高血圧者(高血圧ガイドライン 2009 ではⅡ度高血圧に相当する)で、内服薬の定期的投与を受けていない者 30 名を対象とした飲用試験が行われた。試験群は、*L. helveticus* 発酵乳を含み、甘みや酸味を調整した飲料を 1 日 1 本 120 g(Val-Pro-Pro 2.53 mg、Ile-Pro-Pro 1.52 mg 含有)、8 週間飲用した。対照群は、プラセボ飲料を同様に飲用した。その結果、血圧変化以外には心拍数、血液成分、尿成分に変化はなかった。また、空咳、消化器症状などの副作用も認めなかった[梶本, 2001]。この *L. helveticus* 発酵乳は、血圧降下作用を持つ ACE 阻害ペプチド、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を関与成分とした、血圧が高めの方に適した特定保健用食品に利用され、1997 年より日本国内で発売されている。

従って、*L. helveticus* 発酵乳のホエー成分を粉末化した素材も、その原料発酵乳における動物やヒトでの試験結果から、安全性は非常に高いと考えられる。しかし、粉末化により、発酵乳ホエーの水分が除かれたことで、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の含有量は、原料発酵乳と比較して重量あたり約 60~70 倍になった。その結果、重量当たりで摂取可能な有効成分の量が、これまでの食経験および試験データの範囲を超えたために、新規に過剰摂取時を想定した安全性データが必要となった。

一方で、食品由来の ACE 阻害作用を持つペプチドの有効性に関しては、数多くの報告があるものの、食品由来の ACE 阻害ペプチドや、それを含有する発酵乳素材の安全性に関して科学的に研究して公開されたものは、これまでに殆ど知られていない。そこで、本粉末化素材の安全性に関する科学的根拠の強化のために、特定保健用食品で原則求められる遺伝毒性(染色体異常試験)、急性毒性(単回投与試験)及び、亜急性毒性(28 日間反復投与試験)[内閣府 食品安全委員会, 2004, 2007]について評価を行った。

その結果、チャイニーズハムスターの肺由来の繊維芽細胞を用いた染色体異常試験、SD ラットを用いた単回経口投与および、28 日間反復投

与試験において、いずれも本素材投与が起因と判断される毒性は見られなかった。

5-2. 材料と方法

5-2-1. 染色体異常試験

5-2-1-1. 試験サンプル

試験には、*L. helveticus* 発酵乳ホエー粉末(FM 粉末)を用いた。FM 粉末の製造方法は、9%還元脱脂粉乳を 90℃達温殺菌後に、*L. helveticus* CM4 株を添加し、37℃で 22 時間培養した。カゼインは、遠心で除去し、乳酸は、電気透析により除去した。残った上清にマルトデキストランを賦形剤として添加後、スプレードライすることで、粉末化した[Aihara, 2005]。このようにして得られた FM 粉末 100 g には、Val-Pro-Pro が 105.3 mg、Ile-Pro-Pro が 62.4 mg 含まれていた。(Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の含有量は、出発原料である発酵乳と比較して、重量比で約 60~70 倍に相当する)。

5-2-1-2. 細胞株

指標細胞は、チャイニーズハムスター繊維芽細胞(CHL/IU、国立医薬品食品衛生研究所より分与)を用いた。受領後、細胞は既知の方法[Ishidate, 1978]に従って液体窒素にて保存した。細胞株は、マイコプラズマ汚染のないことを事前に確認した。

5-2-1-3. 試験方法

染色体異常試験は、既知の方法に準じて実施した[Ishidate, 1978]。FM 粉末は生理的食塩水(扶桑薬品工業)に溶解し、細胞増殖のアセスメントや染色体異常形成の評価を行った。FM 粉末の細胞増殖抑制試験では、7、21、62、185、556、1667、そして 5000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ になるように調製して

評価した。染色体異常試験は、1250、2500、5000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で実施した。

陰性対象には、生理食塩水を使用した。陽性対象はマイトマイシン C(和光純薬工業)とベンゾピレン(和光純薬工業)を用いた。マイトマイシン C は、連続処理法と、代謝活性(S9 処置)を行わない S9 無添加培養系列に使用した。ベンゾピレンは、代謝活性 (S9 処置) を行う S9 添加培養系列に使用した。マイトマイシン C は、蒸留水にて溶解し、生理食塩水にて 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ となるように調製した。ベンゾピレンは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解させ 4 mg / ml となるように調製した。

フェノバルビタールと 5、6-ベンゾフラボンを誘導物質として調製されたラット肝臓代謝活性系(S9)は、キッコーマン株式会社より入手し、使用直前まで -80°C で保存した。S9 ミックスは、必要時応じて用事調製した。1 ml の S9 ミックスは、0.3 ml の S9 と、5 μmol の MgCl_2 、33 μmol の KCl 、5 μmol の Glucose-6-phosphate、4 μmol の NADP および、4 μmol の HEPES buffer(pH 7.2)を含む組成とした。

CHL/IU 細胞は、凍結保存していた細胞を解凍後、非働化した仔牛血清(Gibco)を添加した 5ml のイーグルの最小培地(MEM)(Gibco)に接種し、25 cm^2 細胞培養用フラスコ(FALCON)で培養して用いた。培養は、5% CO_2 、湿度 95%、 37°C の条件で行った。

細胞増殖抑制試験には、継代培養した CHL/IU 細胞を、 1×10^4 cells / ml に調製し、必要枚数の 35 mm 細胞培養用シャーレに 2 ml ずつ入れ、3 日間前培養した。各培養系列の用量ごとに 2 枚ずつのシャーレを用いた。24 および 48 時間培養系列では、シャーレに陰性対象物質および各濃度の FM 粉末溶液を 0.1 ml / ml 添加して、24 または 48 時間培養した。

S9 および無添加培養系列では、シャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対照物質または、各濃度の FM 粉末溶液を加え、かつ最終濃度が 5% となる量の S9mix または S9 と同用量の生理食塩水を添加した。同系列ともに 6 時間培養後にシャーレ内を生理食塩水で洗浄した。その後、新鮮培地を加えて 18 時間培養による回復期間を経たあと、培養液を捨てて、シャーレ内を生理食塩水で洗浄後、10%ホルマリン水溶液により細胞を固定し、0.1%クリスタルバイオレットで 10 分間染色した。その後、モノセ

パレーター(オリンパス)でそれぞれのシャーレの染色性から、間接的に細胞増殖率を測定した。

染色体異常試験には、継代培養した CHL/IU 細胞は、 1×10^4 cells / ml に調製し、必要枚数の 60 mm 細胞培養用シャーレ(GREINER)に 5 ml ずつ入れ、3 日間前培養した。連続処理法の 24 及び 48 時間培養系列、短時間処理法の S9 添加及び無添加培養系列の計 4 系列を設定し、各系列の各用量についてシャーレを 2 枚ずつ使用した。

24 及び 48 時間培養系列では、シャーレに陰性対照物質、各濃度の FM 粉末溶液 0.1 ml / ml または、陽性対照物質の MMC を 0.01 ml/ml 添加して 24 時間または 48 時間培養した。

S9 添加及び無添加培養系列では、シャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対象物質又は、各濃度の FM 粉末溶液を、あるいは、陽性対照物質液の MMC を 0.01 ml / ml または、ベンツピレンを 0.005 ml / ml 加え、さらに最終濃度が 5% となるように S9mix または、S9mix と同用量の生理食塩水を添加した。両系列ともに、6 時間培養後にシャーレ内を生理食塩水で洗浄したあと、新鮮培地を加えてさらに 18 時間培養した。

すべての培養系列のシャーレについて培養終了 2 時間前にコルセミド溶液(和光純薬)を最終濃度 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$ となるように加えて分裂中期細胞を蓄積させた。培養終了後、約 37°C でプレインキュベートした 0.25% トリプシン溶液で細胞を剥離し、遠心分離(1000 回転、5 分間)して細胞を集めたあと、 0.075 mol の KCl 溶液により 37°C で 15 分間低張処理した。その後、冷却したカルノア液(メタノール：酢酸が 3:1 の混合液)を 1 ml 加えて遠心分離後、上清を捨てて、さらに 5 ml のカルノア液で細胞を固定した。その後再び遠心分離して同様な処理を以降 2 回繰り返した。最終的に得られた細胞懸濁液は、スライドグラス上に滴下して一晩乾燥させた。その後、ギムザ染色液(メルク社)にて約 15 分間染色後、水洗、乾燥後にプレート標本とした。

5-2-1-4. 観察および評価項目

一標本あたり、100 個の減数分裂中期(例：200 減数分裂中期 / Dose)細胞を 750 倍の顕微鏡(オリンパス)で観察した。

染色体異常の観察については、数的異常は倍数体、構造異常は染色分体型切断(ctb)、染色分体型交換(cte)、染色体型切断(csb)、染色体型交換(cse)、および、その他(o)に分類した。染色分体及び染色体型ギャップ(g)は、上記分類とは別に記録した。ギャップの判定基準は、染色分体型幅よりも狭い非染色性部位のものとした。その他の基準は、1 個の分裂中期像に、多数のギャップ、切断などがあった場合に断片化(Frg)として記録した。これらの異常を 1 個でも有する細胞を異常細胞 1 個として記録した。観察結果より、染色体異常を持つ細胞の出現頻度が陰性対象群と比較して明らかに上昇し、かつ、用量依存性が認められた場合は、または、再現性のある単独な用量での明らかな上昇が認められた場合は陽性と判定し、それ以外は陰性とした。

5-2-2. 単回及び反復投与試験

5-2-2-1. 試験サンプル

被験物には、染色体異常試験で用いたものと同じ、*L.helveticus* 発酵乳ホエー粉末(FM 粉末)を用いた。ラットへ投与する被験物が試験期間中安定であることを担保するために、Val-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro の含有量を指標に、妥当性が担保された定量分析法[Aihara 2005]で分析した。その結果、FM 粉末は、粉末状態で 6 ヶ月間安定であることが確認された(表 5-1)。被験物はラットへ投与するために水に溶解し、5%、10%(w / v%)の溶液を調製した。溶液の調製は、4～7 日おきに作成し、投与日ごとに分注後、使用するまで-20℃で凍結保存した。試験開始時と最終投与時に用いた各群の溶解液の Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の定量値をまとめた(表 5-2)。分析結果から、投与サンプルはいずれも、99%から 105%の範囲に収まっていた。

5-2-2-2. 試薬と実験動物

今回の試験には、6週齢の Sprague-Dawley ラット (Crj:CD(SD)、SPF) を用いた。単回投与試験では雌雄各 15 匹、計 30 匹をランダムにグループ分けして用い、投与当日の体重は雄 152～168 g、雌 113～125 g であった。反復投与試験では雌雄各 40 匹、計 80 匹をランダムにグループ分けして用い、投与当日の体重は雄 181～201 g、雌 130～164 g であった。

飼育室の室温は $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度は $55 \pm 10\%$ 、明暗サイクル 12 時間（明期 6:00-18:00）の条件下で、飲用水と餌 (CRF-1：オリエンタル酵母) は、自由摂取とさせた。

5-2-2-3. 試験方法

単回投与および、28 日間反復投与試験は、医薬品毒性試験法ガイドラインに準じて実施した [厚生省, 1989, 1993]。

単回投与試験は、ラットの体重 1 kg あたり 0 mg、2000 mg、4000 mg になるように投与群を計 3 群設定し、雌雄各 5 匹とした。また、本粉末が食品である発酵乳から調製され、毒性は非常に弱いと推定されることから、ラットへの投与量は、その最大溶解濃度 (20%) および医薬品非臨床試験ガイドライン解説 [厚生省, 1997] で示された投与用量の上限であるラットの体重 100 g あたり 2 ml 投与を考慮し、投与可能最大量の体重 1 kg あたり 4000 mg と、その半分量である 2000 mg の 2 用量とした。ラットは投与前日夕刻より絶食させ、胃ゾンデを用いて単回経口投与した。投与液量はラットの体重 1 kg あたり 20 ml として、対照群は、注射用水を同様量投与した。

28 日間反復投与試験においては、次のように投与群を計 4 群設定し、雌雄各 10 匹とした。すなわち、投与量は、本粉末が食品である発酵乳から調製され、毒性は非常に弱いと推定されることから、医薬品非臨床試験ガイドライン解説 [厚生省, 1997] で示された強制経口投与での技術的に投与可能な用量の上限である、ラット体重 1 kg あたり 2000 mg を高用量とし、以下、公比 2 で、中用量 (ラット体重 1 kg あたり 1000 mg) およ

び低用量(ラット体重 1 kg あたり 500 mg)の投与群を設定した。ラットは投与前日夕刻より絶食させ、胃ゾンデを用いて単回経口投与した。投与液量はラットの体重 1 kg あたり 10 ml として、対照群は、注射用水を同様量投与した。投与期間は、医薬品毒性試験法ガイドラインに準じて 4 週間連日とした。なお、低用量(ラット体重 1 kg あたり 500 mg 投与)は、ヒトでの使用予定量の 10 倍に相当した。

5-2-2-4. 観察および評価項目

単回投与試験において、ラットの一般状態については、投与 6 時間までは頻繁に、それ以降投与 14 日間は、1 日 1 回観察した。体重は投与直前と、投与後 1、2、4、7 および 14 日に測定した。14 日目の最終日においては、すべてのラットをエーテル麻酔下で失血させ、詳細に剖検した。

28 日間連続経口投与試験では、ラットの一般状態については、投与期間中は 1 日 2 回、投与時と投与後 2～4 時間に観察した。全例について体重を投与 1、8、15、22、28 および剖検日に測定し、1 日の摂餌量も記録した。14 日目の最終日は、すべてのラットをエーテル麻酔下で失血させ、詳細に剖検した。投与第 4 週目に全例において、携帯型眼科細隙灯(ナイツ)を用いて眼科検査を行った。同時期に各群雌雄半数例においては、散瞳薬(ミドリン P、参天製薬)を点眼し、眼底や中間透光体を観察した。さらに半数例は、投与第 4 週目に代謝ケージ(飲用水は自由摂取)で飼育し、2 時間分の新鮮尿と 24 時間分の蓄尿を分析した。新鮮尿は、pH、タンパク質、グルコース、ケトン体、ウロビノーゲン、ビリルビン、潜血をペーパー法(マルティスティックス、バイエルメディカル)で分析し、沈殿物と色についても評価した。24 時間蓄尿は、尿量と尿比重計(T2-SE、アタゴ)による測定および、臨床化学自動分析装置(シンクロン CX7 & ベックマン)を用いて電解質(ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール(Cl))を測定した。さらに、全例について剖検時に、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血して分析した。血液学的検査では、EDTA-2 カリウムを添加した血液を用いたが、プロトロンビン時間や、活性化部分トロンボプラスチン時間など、凝固能の検査は、3.8%クエン酸ナトリウムを添加した

血漿を用いた。血液化学的検査では、採血した血液を1時間放置後、3000回転、15分遠心して得られた血液を用いた。ただし、アスパラギン酸トランスアミラーゼおよび、乳酸脱水素酵素の測定には、ヘパリンナトリウムを加えた血漿を用いた。

病理学的検査では、全例において、主要臓器の重量を測定した。眼球は最初に Davidson 溶液で固定後、10%ホルマリン溶液で再固定した。各動物から約 35 種類の臓器と組織を採取し、10%ホルマリン溶液で固定した。すべての対照群と高用量群からの組織は、包埋、薄切の後に、ヘマトキシシン・エオシン(H・E)にて染色し、顕微鏡下で観察した。ただし、高用量群の雄において、腎臓の近位尿細管上皮高酸性小体が認められたため、中用量の雄の腎臓についても同様の手順にて顕微鏡下で観察した。

各群の定量データは、Barlett 法による等分散性の検定を行い、等分散であれば一元配置分散分析を実施し、有意であれば、各群と対照群との統計的差は、Dunnett 法を用いた。等分散でない場合は、Kruskal-Wallis 法で評価し、有意ならば、各群と対照群との統計的差異検出には、順位を利用した Dunnett 法を用いた。

5-3. 結果

5-3-1. 染色体異常試験

染色体異常試験の本試験設定時に必要である、50%細胞増殖抑制濃度を求める試験を行った。その結果、FM粉末は、いずれの用量においても細胞増殖率は50%を下回ることはなかった。この結果より、染色体異常試験に用いる被験物の濃度は、最高用量である5000 µg / mlとし、以下公比2で、2500、1250 µg / mlの計3用量とした。

染色体異常試験の結果、FM粉末群すべての培養系列において、構造異常を有する細胞の出現頻度は0～1.0%、数的異常(倍数体)を有する差相棒の出現頻度は、0～0.5%であり、陰性対照群と差はなかった(表5-3、5-4)。

5-3-2. 単回投与試験

一般状態の観察の結果、雌雄ともに観察期間を通して死亡例はなかった。なお、高用量群(ラット体重1kgあたりFM粉末を4000 mg投与)において、雌1例、投与翌日に雄1例に軟便が認められた。投与後7～14日にかけて対照群を含む雄の各群に軟便と、肛門周辺の糞便の汚れが散見されたが、投与量に関連したものではなかった。また、いずれの投与群と対照群において、体重推移に差はなく、剖検の結果、すべての動物に異常は確認されなかった(データ未発表)。

5-3-3. 反復投与試験

すべての動物は、試験期間中に体重が増加したが、群間に有意な差は得られなかった(表5-5)。食餌摂取量についても、同様に群間で有意な差は確認されなかった(データ未発表)。

一般状態は、投与期間中、中用量群(ラット体重 1kg あたり FM 粉末を 1000mg 投与)の雌雄と高用量群(ラット体重 1kg あたり FM 粉末を 2000 mg 投与)の雄で、軟便又は肛門周囲の汚れが散見され、また、対照群および低用量(ラット体重 1kg あたり 500mg)の雄各 1 例に紅涙又は紅涙痕が認められたが、いずれも単発性の変化であり、投与量に関連したものではなかった。眼科所見についても、FM 投与に起因すると考えられる結果は得られなかった(データ未発表)。

尿検査の結果、数匹のオスのラットが蛋白尿とケトン体尿を示したが、これらの小さな変化は、対照群と FM 粉末投与群の両方にみられた(表 5-6)。一方、尿沈渣のなかから、白血球と上皮細胞が見られたが、対照群およびいずれの用量の FM 粉末群からも同様に検出された(表 5-7)。尿量および電解質については、すべての群において差がなかった(表 5-8)。

血液学的検査および血液化学的検査の結果は、表 5-9、5-10 にまとめた。血液学検査においては、低用量(ラット体重 1 kg あたり 500 mg 投与)の雄にヘマトクリット値(Ht)およびヘモグロビン量(Hb)の有意な高値が認められたが、投与量に関連した変化ではなかった。血液化学的検査では、高用量群(ラット体重 1 kg あたり 2000 mg 投与)の雄にクロル(Cl)の有意な低値が認められたが、生理学的変動範囲内の変化であった。なお、高用量群(ラット体重 1 kg あたり 2000 mg)群の雄 1 例にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)およびアラニンアミノトランスアミラーゼ(ALT)の高値が認められた。

臓器の平均重量を調べた結果、投与群におけるいずれの臓器の重量は、コントロール群のそれと比較して、区別できるものはなかった(表 5-11)。病理学的検査の結果、高用量群(ラット体重 1 kg あたり 2000mg)の雄 1 例の腎臓表面に微小白色点の散在、他 1 例の肝臓外側右葉および方形葉の肥大と横隔膜への癒着が認められた。そのほかの例に変化は認められなかった(表 5-12)。

表 5-1 単回および 28 日間反復投与試験に用いた FM 発酵乳粉末の安定性

Analyte (mg / g of powder)	At preparation	Prior to toxicology studies	4 months after manufacture	6months after manufacture
Val-Pro-Pro	0.933	0.932	0.966	0.937
Ile-Pro-Pro	0.534	0.530	0.554	0.564

表 5-2 28 日間反復投与試験で用いた投与サンプル中の Val-Pro-Pro と
Ile-Pro-Pro の分析値

Test substance target concentrations (mg / ml)	Detected concentrations (mg / ml)							
	Test substance prepared for first day of dosing				Last test substance preparation			
	Test substance	%of target	Val-Pro- Pro	Ile-Pro- Pro	Test substance	%of target	Val-Pro- Pro	Ile-Pro- Pro
50	51.98	104	0.047	0.028	49.91	99	0.047	0.026
100	105.18	105	0.096	0.057	102.35	102	0.096	0.054
200	204.55	102	0.186	0.111	205.76	103	0.194	0.108

表 5-3 FM発酵乳粉末の染色体異常試験の結果（単時間処置法）

Exposure recovery time (h)	S9 mix	Concentration ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Number and the percentages(%) of cells showing structural chromosomal aberrations							Total gaps of chromatid and chromosome	Cell growth index (%)	Number and mean percentage(%) of cells showing polyploids			
			No. of observed cells	Chromatid breaks	Chromatid exchanges	Chromosome breaks	Chromosome exchanges	Others	Total number			No. of observed cells	Polyploids	Others	Total number
6-18	-	Negative control (Saline)	200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	100	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	-	1250	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	101	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	-	2500	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	86	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	-	5000	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	85	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	-	Positive control (MMC) ^a	200	6(3.0)	26(13.0)	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	37(17.5)	3(1.5)		200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
6-18	+	Negative control (Saline)	200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	100	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	1250	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)		200	1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)
6-18	+	2500	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	96	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	5000	200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	89	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
6-18	+	Positive control (B(a)P) ^b	200	33(16.5)	57(28.5)	1(0.5)	6(3.0)	0(0.0)	86(43.0)	11(5.5)		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

^a 0.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ mitomycin C.^b 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ benzo(a)pyrene.

表 5-4 FM発酵乳粉末の染色体異常試験の結果（連続処置法）

		Number and the percentages(%) of cells showing structural chromosomal aberrations							Total gaps of chromatid and chromosome	Cell growth index (%)	Number and mean percentage(%) of cells showing polyploids			
Treatment time (h)	Concentration (µg / ml)	No. of observed cells	Chromatid breaks	Chromatid exchanges	Chromosome breaks	Chromosome exchanges	Fragments	Total number			No. of observed cells	Polyploids	Others	Total number
24	Negative control (Saline)	200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	100	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
24	1250	200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	99	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
24	2500	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	96	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
27	5000	200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	97	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
24	Positive control (MMC) ^a	200	39(19.5)	50(25.0)	1(0.5)	5(2.5)	0(0.0)	82(41.0)	13(6.5)		200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
48	Negative control (Saline)	200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	100	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
48	1250	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		200	1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)
48	2500	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	98	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
48	5000	200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	91	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
48	Positive control (MMC) ^a	200	46(23.0)	81(40.5)	1(0.5)	10(5.0)	3(1.5)	117(58.5)	11(5.5)		200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)

^a 0.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ mitomycin C.

表 5-5 FM 粉末の 28 日間反復投与試験の期間中のラットの体重値

	Control (n=10)	500 mg / kg (n=10)	1000 mg / kg (n=10)	2000 mg / kg (n=10)
Male				
Treatment day 1	192.2±5.7	192.9±4.3	192.5±5.5	193.5±6.0
8	247.7±11.3	247.1±6.9	249.0±8.9	253.2±12.1
15	296.1±16.0	296.8±12.8	300.5±12.0	307.4±15.2
22	334.0±20.1	337.0±16.0	340.9±15.9	350.0±17.6
28	361.1±21.4	366.2±18.7	369.2±18.9	380.0±20.9
Necropsy ^b	334.9±19.0	336.6±16.8	340.8±14.9	351.3±19.6
Female				
Treatment day 1	149.4±8.4	150.5±7.2	150.4±8.1	148.1±10.0
8	162.4±9.7	168.9±12.7	167.4±10.1	164.4±12.2
15	181.6±15.4	186.5±15.8	185.8±12.3	181.9±14.5
22	196.6±16.6	205.1±18.9	200.3±15.6	196.5±16.1
28	206.8±17.4	212.4±20.1	205.9±14.4	206.9±16.6
Necropsy ^b	190.8±16.7	195.7±16.6	191.4±13.1	190.5±14.3

^a Values are the mean ±SD

^b Rats were fasted overnight before sacrifice and necropsy.

There were no significant difference between dosed and control group.

表 5-6 FM 粉末の 28 日間反復投与試験におけるラットの尿検査値①

Sex	Dose (mg / kg)	Color			pH				Protein		Glucose -	Ketose		UB	Bili	Occult blood
		Y	TY	AU	6.5	7.0	8.0	8.5	-	±		-	±	±	-	-
Male	Control	-	5	-	-	-	1	4	1	4	-	3	2	5	5	5
	500	1	4	-	-	-	-	5	1	4	-	3	2	5	5	5
	1000	2	3	-	-	-	-	5	2	6	-	2	3	5	5	5
	2000	1	3	1	-	-	-	5	3	5	-	4	1	5	5	5
Female	Control	-	5	-	-	1	2	2	5	-	-	5	-	5	5	5
	500	-	5	-	-	-	2	3	5	-	-	5	-	5	5	5
	1000	1	3	1	-	-	1	4	5	-	-	5	-	5	5	5
	2000	2	3	-	1	1	2	1	4	1	-	5	-	5	5	5

Color Y: Yellow, TY: Thin yellow, AU: Achromatic urine.

Protein -: negative, ± trace. Glucose -: negative. Ketone -: negative. UB(Urobilinogen) ±: 0.1~1Ehr./dL.

Bili(Bilirubin) -: negative. Occult blood -: negative.

Note. Date are expressed as number of animals(n/5) exhibiting the indicated result.

表 5-7 FM 粉末の 28 日間反復投与試験におけるラットの尿検査値②
(尿沈渣)

Sex	Dose (mg / kg)	RBC	WBC		Epithelial cell		Cast	AMP		AP	
		-	-	±	-	±	-	-	±	-	±
Male	Control	5	2	3	1	4	5	5	-	5	-
	500	5	3	2	-	5	5	5	-	5	-
	1000	5	2	3	-	5	5	4	1	5	-
	2000	5	3	2	-	5	5	4	1	5	-
Female	Control	5	1	4	-	5	5	4	1	5	-
	500	5	4	1	1	4	5	4	1	4	1
	1000	5	5	-	1	4	5	3	2	5	-
	2000	5	3	2	1	4	5	4	1	5	-

RBC -: 0(cell/field examined by high power).

WBC -: 0, ±: <6(cells/field examined by high power).

Epithelial cell -: 0, ±: <6(cells/field examined by high power).

Cast -: negative.

AMP(Ammonium magnesium phosphate) -: negative, +: positive.

AP(Amorphous phosphate) -: negative, +: positive.

Note. Date are expressed as number of animals(n/5) exhibiting the indicated result.

表 5-8 FM 粉末の 28 日間反復投与試験におけるラットの尿検査値③
(尿量、電解質)

		Control (n=5)	500 mg / kg (n=5)	1000 mg / kg (n=5)	2000 mg / kg (n=5)
Male					
Volume	(ml)	19.1±3.6	16.6±3.5	17.1±3.9	17.8±6.1
Specific gravity		1.040±0.006	1.048±0.011	1.048±0.010	1.046±0.011
Na	(mEq / L)	89.6±14.9	112.0±19.2	112.4±19.6	112.4±33.4
K	(mEq / L)	226.9±36.8	278.8±68.1	257.6±49.3	255.8±50.3
Cl	(mEq / L)	138.2±23.6	173.4±40.1	158.6±26.3	162.8±35.6
Total excretion	(mg / day)				
Na		38±4	42±8	43±7	43±4
K		166±20	174±12	166±18	169±29
Cl		92±10	99±10	94±13	97±14
Female					
Volume	(ml)	13.3±3.5	15.9±5.4	9.7±3.8	13.8±2.6
Specific gravity		1.042±0.004	1.033±0.008	1.051±0.012	1.035±0.005
Na	(mEq / L)	103.8±14.0	80.8±25.4	134.0±34.0	93.4±8.2
K	(mEq / L)	221.3±24.5	188.6±47.9	284.5±61.6	196.3±40.6
Cl	(mEq / L)	135.0±19.0	110.6±28.5	177.0±37.4	120.6±13.4
Total excretion	(mg / day)				
Na		31±6	27±4	29±8	30±5
K		114±26	110±17	102±23	104±17
Cl		63±16	59±12	58±13	58±9

Values are the mean±SD.

Not significantly different from the control.

表 5-9 FM 粉末の 28 日間反復投与試験におけるラットの血液学的検査結果

		Control (n=10)	500 mg / kg (n=10)	1000 mg / kg (n=10)	2000mg/kg (n=10)
Males					
RBC	($10^4 / \text{mm}^3$)	807±38	823±30	833±25	819±32
WBC	($10^2 / \text{mm}^3$)	103.5±17.3	106.7±28.7	101.7±23.0	97.3±23.3
Ht	(%)	43.8±1.2	45.5±1.4 *	46.1±0.9 * *	44.7±1.7
Hb	(g / dL)	15.8±0.4	16.4±0.4 *	16.6±0.3 * *	16.1±0.6
MCH	(pg)	19.6±0.8	19.9±0.5	19.9±0.6	19.7±0.6
MCV	(μ^3)	54.4±2.1	55.2±1.6	55.2±1.4	54.6±1.1
MCHC	(%)	36.0±0.2	36.0±0.3	36.0±0.2	36.1±0.6
Reti.	(‰)	30.0±6.0	32.6±8.1	31.1±6.5	31.4±7.7
Pl.	($10^4 / \text{mm}^3$)	102.5±7.0	101.9±8.7	96.1±5.9	99.0±7.7
PT	(sec)	12.3±0.8	12.6±0.7	11.9±0.4	12.3±0.6
APTT	(sec)	34.0±4.0	35.4±4.3	31.2±2.8	32.4±3.2
Differential leukocyte(%)					
Basophil		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Eosinophil		0.6±0.7	0.9±0.6	0.4±0.7	0.9±0.9
Stab neutrophil		0.0±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Segmented neutrophil		17.7±6.2	16.2±4.8	15.9±4.8	15.7±4.3
Lymphocyte		79.7±6.2	81.0±5.3	82.0±5.2	81.5±4.6
Monocyte		2.0±0.8	1.9±0.7	1.7±1.3	1.9±1.0
Females					
RBC	($10^4 / \text{mm}^3$)	830±28	22±34	826±32	839±29
WBC	($10^2 / \text{mm}^3$)	68.3±17.5	78.2±25.3	71.1±18.8	73.4±20.2
Ht	(%)	45.1±1.3	44.4±1.8	44.8±1.1	45.3±1.4
Hb	(g / dL)	16.4±0.5	16.2±0.7	16.3±0.4	16.6±0.5
MCH	(pg)	19.7±0.5	19.7±0.5	19.7±0.5	19.8±0.9
MCV	(μ^3)	54.3±1.1	54.2±1.1	54.4±1.3	54.0±2.3
MCHC	(%)	36.3±0.4	36.6±0.3	36.4±0.2	36.6±0.3
Reti.	(‰)	25.5±4.6	24.4±5.7	24.4±3.5	25.5±5.1
Pl.	($10^4 / \text{mm}^3$)	97.7±5.7	107.4±9.6	100.0±10.6	100.1±9.0
PT	(sec)	11.8±0.6	12.2±0.5	11.7±0.6	12.4±0.7
APTT	(sec)	27.2±2.6	28.8±3.5	28.6±3.6	28.5±3.8
Differential leukocyte(%)					
Basophil		0.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Eosinophil		1.0±1.1	1.0±0.7	0.9±0.7	1.2±0.8
Stab neutrophil		0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Segmented neutrophil		13.0±2.9	12.6±4.4	13.6±4.6	13.4±4.6
Lymphocyte		84.5±2.4	85.0±4.3	84.5±4.8	84.3±5.3
Monocyte		1.4±1.0	1.4±0.7	1.0±0.8	1.1±1.0

Values are the mean±SD.

* : $p < 0.05$; * *: $p < 0.01$: Significantly different from the control.

RBC (red blood cell count), WBC (white blood cell count), Ht (hematocrit), Hb (hemoglobin)

MCH (mean corpuscular hemoglobin), MCV (mean corpuscular volume),

MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), Reti. (reticulocyte count),

Pl (platelet count), PT(prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time)

表 5-10 FM 粉末の 28 日間反復投与試験でのラットの血液化学的検査結果

		Control (n=10)	500 mg / kg (n=10)	1000 mg / kg (n=10)	2000 mg / kg (n=10)
Males					
AST	(IU / L)	58.4±9.6	54.7±4.2	58.7±6.0	58.4±17.9
ALT	(IU / L)	24.3±4.6	21.9±2.8	23.7±3.2	23.6±7.9
ALP	(IU / L)	160.6±38.5	152.7±25.4	149.0±27.3	155.5±18.5
LDH	(IU / L)	152.9±25.1	133.9±15.2	160.2±35.0	127.3±33.0
γ-GTP	(IU / L)	1.26±0.44	1.20±0.57	1.25±0.38	1.22±0.47
Glc.	(mg / dL)	122±16	128±20	112±19	132±24
T.Cho.	(mg / dL)	36±7	36±5	34±7	40±11
TG	(mg / dL)	56±17	72±33	57±19	67±33
PL	(mg / dL)	109±10	115±11	104±13	116±16
TP	(g / dL)	5.6±0.2	5.7±0.1	5.6±0.2	5.5±0.1
Alb.	(g / dL)	2.3±0.1	2.3±0.0	2.4±0.1	2.2±0.1
A/G		0.69±0.03	0.69±0.02	0.73±0.03	0.67±0.04
BUN	(mg / dL)	16.1±1.4	17.0±1.3	17.9±1.2	17.6±2.8
Crea.	(mg / dL)	0.48±0.06	0.48±0.05	0.52±0.05	0.46±0.05
T.Bil.	(mg / dL)	0.45±0.04	0.43±0.07	0.43±0.08	0.41±0.09
Na	(mEq / L)	145±1	145±1	145±1	145±2
K	(mEq / L)	4.7±0.3	4.6±0.4	4.7±0.3	4.6±0.4
Cl	(mEq / L)	112±1	112±2	112±1	111±1
P	(mEq / L)	7.6±0.6	7.8±0.5	7.9±0.6	8.1±0.8
Ca	(mEq / L)	9.3±0.2	9.2±0.2	9.2±0.2	9.2±0.2
Protein fraction (%)					
Albumin		57.3±1.9	56.6±1.5	56.3±1.9	55.9±1.9
α-1 globulin		15.4±0.9	16.0±1.0	16.1±1.7	16.4±1.6
α-2 globulin		5.3±0.5	5.5±0.5	5.7±0.7	5.5±0.4
β globulin		17.8±0.9	17.4±0.6	17.6±1.1	18.0±1.2
γ globulin		4.2±0.7	4.5±1.2	4.3±0.9	4.3±0.7
Females					
AST	(IU / L)	57.4±7.1	54.3±5.6	57.9±10.0	56.9±5.7
ALT	(IU / L)	20.6±2.9	20.8±4.9	21.6±7.8	21.5±4.5
ALP	(IU / L)	100.8±36.9	86.2±25.6	82.6±19.0	84.1±17.7
LDH	(IU / L)	124.5±38.4	116.0±11.7	129.2±32.7	117.3±18.8
γ-GTP	(IU / L)	1.58±0.44	1.34±0.55	1.37±0.55	1.39±0.34
Glc.	(mg / dL)	96±11	101±20	99±14	101±15
T.Cho.	(mg / dL)	41±7	37±9	37±7	39±8
TG	(mg / dL)	20±9	22±9	26±16	22±12
PL	(mg / dL)	140±17	132±23	135±20	137±18
TP	(g / dL)	5.9±0.3	5.9±0.3	5.9±0.4	5.8±0.2
Alb.	(g / dL)	2.5±0.2	2.6±0.1	2.6±0.2	2.5±0.1
A/G		0.76±0.04	0.79±0.04	0.77±0.03	0.79±0.03
BUN	(mg / dL)	20.1±2.4	19.4±2.2	19.1±2.4	19.7±1.9
Crea.	(mg / dL)	0.55±0.04	0.50±0.05	0.57±0.06	0.52±0.07
T.Bil.	(mg / dL)	0.38±0.12	0.38±0.12	0.46±0.14	0.41±0.14
Na	(mEq / L)	145±2	146±1	146±2	146±1
K	(mEq / L)	4.4±0.4	4.6±0.3	4.6±0.4	4.6±0.3
Cl	(mEq / L)	115±1	115±1	114±1	113±2*
P	(mEq / L)	6.6±0.8	6.4±1.0	6.4±1.1	6.6±0.8
Ca	(mEq / L)	9.4±0.2	9.4±0.2	9.4±0.2	9.3±0.2
Protein fraction (%)					
Albumin		59.1±1.9	60.7±1.6	60.0±1.7	60.2±1.8
α-1 globulin		13.3±0.9	12.8±1.3	12.4±1.8	12.5±1.4
α-2 globulin		5.7±0.6	5.4±0.5	5.6±0.7	5.6±0.6
β globulin		16.5±0.9	15.9±0.8	16.8±1.2	16.0±0.9
γ globulin		5.5±1.2	5.3±0.8	5.3±0.7	5.7±0.9

Values are the mean±SD.

* : $p < 0.05$: Significantly different from the control.

AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase),

LDH (lactate dehydrogenase), γ-GTP (γ-glutamyltransferase),

Glc. (glucose), T.Cho. (total cholesterol), TG (triglyceride), PL (phospholipid), TP (total protein),

Alb.(albumin), A/G (albumin/globulin ratio), BUN (urea nitrogen), Crea. (Creatinine), T.Bil.(Total Bilirubin),

Na (sodium), K(potassium), Cl (chlorine), P (inorganic phosphorus), Ca(calcium)

表 5-11 FM 粉末の 28 日間反復投与試験におけるラットの臓器重量

		Control (n=10)	500 mg / kg (n=10)	1000 mg / kg (n=10)	2000 mg / kg (n=10)
Males					
Brain	(g)	1.97±0.06	1.96±0.06	2.03±0.05	1.99±0.06
Pituitary gland	(mg)	11.8±1.7	11.9±1.2	11.8±1.1	12.2±1.6
Thyroid glands	(mg)	21.6±3.4	19.5±2.0	19.8±2.7	21.3±2.7
Submaxillary glands	(mg)	548±38	576±43	585±39	575±65
Thymus	(mg)	470±69	487±120	489±141	539±78
Heart	(mg)	1056±97	1022±81	1060±88	1098±142
Lung	(g)	1.20±0.07	1.17±0.07	1.18±0.05	1.18±0.10
Liver	(g)	10.02±1.01	9.99±0.81	9.86±0.60	10.57±1.02
Spleen	(mg)	603±56	573±69	617±61	588±49
Kidneys	(g)	2.35±0.22	2.29±0.12	2.30±0.11	2.50±0.26
Adrenal glands	(mg)	47.6±7.3	51.2±6.0	53.1±9.2	48.7±7.6
Testes	(g)	3.03±0.22	2.98±0.15	3.08±0.23	3.12±0.24
Seminal vesicles	(mg)	1181±239	1158±165	1097±122	1102±279
Prostate	(mg)	774±157	730±132	742±77	712±100
Females					
Brain	(g)	1.84±0.03	1.83±0.06	1.83±0.10	1.86±0.07
Pituitary gland	(mg)	11.9±2.1	12.4±2.0	12.5±1.8	11.3±1.6
Thyroid glands	(mg)	14.0±2.2	14.3±1.4	14.8±2.4	13.6±1.6
Submaxillary glands	(mg)	373±30	353±32	372±43	352±40
Thymus	(mg)	308±82	379±73	367±100	367±134
Heart	(mg)	637±59	674±66	669±69	641±54
Lung	(g)	0.87±0.09	0.90±0.08	0.89±0.09	0.87±0.08
Liver	(g)	5.65±0.52	5.90±0.64	5.80±0.52	5.54±0.50
Spleen	(mg)	370±40	404±84	406±58	395±76
Kidneys	(g)	1.40±0.13	1.42±0.13	1.46±0.12	1.41±0.12
Adrenal glands	(mg)	56.4±7.8	54.6±7.9	57.7±6.8	55.1±8.4
Ovaries	(mg)	106.3±9.2	109.5±16.9	110.8±11.5	107.2±11.6
Uterus	(mg)	415±94	387±78	417±86	416±101

Values are the mean±SD.

表 5-12 FM粉末の28日間反復投与試験における、病理学的検査結果まとめ

1. Males

	Control										1000 mg / kg										2000 mg / kg									
	Animal no.										Animal no.										Animal no.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Liver																														
Focal hemorrhage	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
Focal fibrous thickening of capsule	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—											—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
Kidney																														
Eosinophilic bodies in proximal tubular epithelium	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	—

∴ NO Change, 1: Slight, 2: Moderate, / : not examined.

No significant changes were detected: Cerebrum, Cerebellum, Spinal cord, Heart, Thymus, Spleen, Mesenteric lymph node, Femur, Sternum, Trachea, Bronchus, Lung, Submaxillary gland, Pancreas, Tongue, Esophagus, Stomach, Duodenum, ileum, Colon, Urinary bladder, Testis, Epididymis, Seminal vesicle, Prostate, Mammary gland, Pituitary gland, Thyroid gland, Harderian gland, Adrenal gland, Skin, Femoral muscle, Eyeball.

2. Females

	Control Animal no.										1000 mg / kg Animal no.										2000mg / kg Animal no.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Abnormalities	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NO Significant changes were detected: Cerebrum, Cerebellum, Spinal cord, Heart, Thymus, Spleen, Mesenteric lymph node, Femur, Sternum, Trachea, Bronchus, Lung, Submaxillary gland, Liver, Pancreas, Tongue, Esophagus, Stomach, Duodenum, ileum, Colon, Kidney, Urinary bladder, Ovary, Uterus, Vagina, Mammary gland, Pituitary gland, Thyroid gland, Harderian gland, Adrenal gland, Skin, Femoral muscle, Eyeball.

5-4. 考察

本検討は、*L. helveticus* 発酵乳のホエー成分を粉末化した素材(FM 粉末)の遺伝毒性と急性および亜急性毒性に関わる試験を実施し、安全性に関する基礎知見を得ることを目的とした。遺伝毒性については、FM 粉末が染色体異常を引き起こすか否かについてチャイニーズハムスター由来の繊維芽細胞株(CHL / IU 細胞)を用いて評価した。その結果、本試験系で評価可能な上限の濃度においても、FM 粉末は、染色体異常を引き起こさなかったことから、遺伝毒性は低いものと結論付けた。また、別の遺伝毒性評価において、*in vivo* の遺伝毒性試験である、げっ歯類に経口投与する小核試験を実施した結果、陰性の結果が得られている[Matsuura, 2005]ことから、FM 粉末の遺伝毒性は低いことが裏付けられた。

次に、FM 粉末の過剰摂取を想定したラットへの経口投与試験を実施した。単回経口投与毒性を検索した結果、FM 粉末をラット体重 1 kg あたり 4000 mg 投与した群において、投与当日から翌日にかけて雌雄各 1 例に軟便が認められたが、単発的な変化であり、その他、一般状態、体重推移並びに剖検では以上は認められなかったために、毒性学的意義はないものと考えられた。従って、FM 粉末は、ラット体重 1 kg あたり 4000 mg までの単回経口投与では、毒性はないものと推察された。

4 週間反復経口投与毒性を検索した結果、一般状態、体重推移、摂餌量、眼科学的検査、尿検査において、FM 粉末の投与と思われる変化は認められなかった。剖検の結果、高用量群(ラット体重 1 kg あたり FM 粉末を 2000 mg 投与)の雄 1 例の腎臓表面に微小白色点の散在、組織学的検査で、本例と他 1 例の腎臓の近位尿細管上皮に好酸性小体が認められたが、近位尿細管上皮の好酸性小体は、通常雄に認められるものであり[Enomoto, 1987]、本試験でも対照群の雄で同様の変化が認められた。また、血液化学的検査および尿検査で、これら 2 例を含め、腎機能異常を示す所見は認められず、毒性学的には意義は無いものと推察された。

血液学的検査においては、唯一の統計学的に有意な変化は、低および中用量投与のオスラット群において、ヘマトクリット値(Ht)とヘモグロビン量(Hb)に関する血液学的パラメータが 3.8%から 5.2%に上昇したことであった。この結果は、高用量群のラットや性別の違いでは確認され

なかった。この高用量において検出された変化は、用量依存性を欠いていることから、FM 投与によるものではないと推察された。メスラットにおいては、血液学的検査では有意な変化は確認されなかった(表 7)。高用量群における平均の血清中塩化物濃度は、わずかに(1.7%)および、対照群と比較して有意に低かった。しかしこの現象の値は非常に小さいために、毒性学的な差としては意味をなさないと考えられた。

また、高用量群(ラット体重 1 kg あたり FM 粉末 2000 mg 投与)の雄 1 例がアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)およびアラニンアミノトランスアミラーゼ(ALT)の高値を示し、肝臓に外側右葉及び、方形葉の肥大と横隔膜への癒着、組織学的検査で同部位にうっ血性及び局限性の皮膜肥厚が認められたために、これが、AST と ALT 値に関係していると考えられた。しかし、これらは同部位に局限した変化で、他葉には異常は認められず、また、高用量群の残り 9 匹の雄および、10 匹の雌の肝臓の顕微鏡像に異常が認められなかったことから、高用量群の雄 1 例で得られた肝臓の変化は、偶発的なものと考えられた。従って、FM 粉末のラットにおける 4 週間反復投与試験では、ラット体重 1 kg あたり 2000 mg 投与では毒性を示さないものと判断された。

以上の経口投与試験の結果、FM 粉末に対して、ラットは、今回投与した量よりも耐性がある可能性が示された。しかし、FM 粉末の物理化学的特性より、20%以上の溶液は調製できないことと、今回設定した投与量が医薬品非臨床試験ガイドライン解説に記載された上限であったことから、これ以上高い濃度での試験はできない。従って、今回の経口投与試験では、全身毒性は観察されなかったもので、最大耐用量(MTD)は算出できなかったが、28 日間反復投与試験の結果を踏まえると、ラットへの MTD は、雄雌ともに体重 1 kg あたりの 1 日の摂取量は 2000 mg 以上であると結論づけられた。この試験結果は、FM 粉末の安全性が高いことを支持する科学的な根拠となるとともに、さらに詳細な安全性について、動物で評価することが必要になった場合の試験系や、投与量決定の根拠として活用することが期待できる。

5-5. 参考文献

- Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R., Nakamura, Y.
Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus*
on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension.
J. Am. Coll. Nutr. 2005; 24: 257-265.
- Enomoto, M., Akazaki, K. Color atlas of toxicological pathology. Tokyo,
Japan: Soft Science Co., Ltd. 1987.
- Hata Y, Yamamoto M, Omni M, Nakajima K, Nakamura Y, Takano T. A
placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood
pressure in hypertensive subjects. Am. J. Clin. Nutr. 1996; 64:
767-771.
- Ishidate, M. Detection of mutagen based on chromosomal aberration
[in Japanese.] Mutagen. Toxic. 1978; 1: 64-73.
- Jauhiainen T, Korpela R. Milk peptides and blood pressure. J. Nutr.
2007; 137; 3: 825S-829S.
- Matsuura, K., Mennear, JH., Maeno, M., Bernard, BK. Studies of the
toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline
and L-isoleucyl-prolyl-L-proline): VII. Micronucleus test of
tripeptides-containing casein hydrolysate and *Lactobacillus*
helveticus - fermented milk powders in rats and mice. Int. J.
Toxicol. 2005; 24(Suppl. 4): 91-96.
- Metchnikoff, E. The prolongation of life: Optimistic Studies. CP
Putnam's Sons. New York. 1908 (メチニコフ E. 平野威馬雄 訳 長
寿の研究-楽観論者のエッセイ. 幸書房 2006.).
- Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Decrease of tissue angiotensin
I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in
spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 1996;
60: 488-489.
- 荒井幸一郎, 室田一也, 早川邦彦, 片岡元行, 光岡知足. 殺菌発酵乳投与
マウスの寿命, 腸内菌叢におよぼす影響について, 栄養と食糧 1980;
33: 219-223.

- 板倉弘重，池本真二，寺田幸代，近藤和雄．酸乳の高血圧者および正常高血圧者に対する影響．日本臨床栄養学会雑誌 2001; 23: 26-31.
- 厚生省 医薬品毒性試験法ガイドライン 平成元年 9 月 11 日 薬審 1 第 24 号．1989.
- 厚生省 単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について 平成 5 年 8 月 10 日 薬新薬第 88 号．1993.
- 厚生省 薬務局審査課（監修）医薬品非臨床試験ガイドライン解説 1997. 薬事日報社 1997.
- 梶本修身，中村康則，屋田裕二，森口盛雄，平田洋，高橋丈生．酸乳の軽症および中等症高血圧者に対する降圧効果．日本栄養・食糧学会誌 2001; 54: 347-354.
- 久住朝子，前野正文，乳酸菌と酵母の共生・共存によって生み出されるおいしさ．日本乳酸菌学会誌 2013; 24: 101.
- 高野俊明，中村康則，横倉輝男，阿部文明 乳酸菌の科学と技術．乳酸菌研究集談会編 1996; 311-341.
- 内閣府 食品安全委員会 HP 特定保健用食品の安全性評価に関する基本的考え方 2004.
- <http://www.fsc.go.jp/senmon/sinkaihatu/index.html>
(accessed 11.4.2013)
- 内閣府 食品安全委員会 HP 特定保健用食品個別製品ごとの安全性評価等の考え方について 2007.
- <http://www.fsc.go.jp/senmon/sinkaihatu/index.html>
(accessed 11.4.2013)
- 中島久実子，中村康則，高野俊明，秦葭 哉 酸乳経口摂取と消化器症状について - 消化管に対する最大無作用量と 50% 効果量の検討 -. Progress in Medicine 1996; 16: 917-921.
- 中村康則，梶本修身，金子京子，相原浩太郎，水谷潤，池田なぎさ，西村明，梶本佳孝 「ラクトトリペプチド(VPP,IPP)」を含有する液状ヨーグルトの長期摂取が正常高値血圧に及ぼす影響．健康・栄養食品研究 2004; 7: 123-137.
- 森敦 発酵乳(ヨーグルト)などに用いられる乳酸菌の機能 乳酸菌の保健機能と応用 上野川修一監修．シーエムシー出版 2007; 147-156.

第 6 章 総括と展望

ペプチドは、構成されるアミノ酸の種類と配列の組合せにより、血圧降下作用などの様々な生理活性を発揮する。そこで、機能性食品への応用が期待され、一般的には、乳タンパク質はじめとする食品タンパク質を消化酵素などで分解して製造される。なかでも、発酵乳は、乳酸菌が保有するプロテアーゼの作用で乳タンパク質が分解された様々なペプチドを含有しているために、天然の風味良好なペプチド素材として有望である。

乳酸菌のプロテアーゼ活性は、乳酸球菌よりも乳酸桿菌のほうが強いことが知られているが、乳酸桿菌のなかでも特に乳酸菌 *L. helveticus* は、タンパク質分解活性が強い。これまでに、*L. helveticus* を含むスターターを用いて 37℃ で 24 時間発酵させた発酵乳から、ACE 阻害活性をもつペプチド Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro が見出された。しかし、この発酵乳は、発酵で生じた乳酸が強い酸味を呈するために、風味や嗜好性の観点から、直接飲用が困難なことが課題であった。

一方で、発酵を 10 時間程度で止めて酸味を抑えた *L. helveticus* 発酵乳や、*L. helveticus* の菌体から精製したプロテアーゼでカゼインを直接分解したペプチドにも、自然発症高血圧ラット (SHR) への経口投与で血圧降下作用が示されたため、風味良好な機能性食品開発の可能性が示された。さらに、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を含んだ酸味の強い *L. helveticus* 発酵乳についても、乳酸を低減した粉末化素材が開発された。これによっても酸味の影響を回避した食品開発への応用可能性が広がったが、原料発酵乳由来の様々な成分が濃縮されたため、過剰摂取を想定した安全性を考察する必要が生じた。

本研究では、機能性食品に利用可能な風味良好な血圧降下ペプチド素材の開発に向けて、*L. helveticus* が生成する VPP と IPP 以外の血圧降下ペプチドの存在と、その作用メカニズムを明らかにして、それらを機能性食品としての利用可能性を探るための基礎的知見を得ることを第一の目的とした。次に、*L. helveticus* 発酵乳の乳酸低減粉末の実用化に向けた一助とすべく、本粉末素材について、動物細胞および動物を用いて安全性に関する基礎知見を得ることを第二の目的とした。

第 1 章では、*L. helveticus* 発酵乳の血圧降下作用を持つ機能性食品としての有用性と課題をレビューした。生体の血圧調節メカニズムのなかで、血圧上昇の中心的役割を果たしているのが、レニン-アンジオテンシン系である。そのなかのアンジオテンシン変換酵素(ACE)は、昇圧物質であるアンジオテンシンⅡの生成と、降圧物質であるブラジキンの分解の両方を行うことで、強力に血圧上昇を引き起こす。従って、ACE の酵素活性を阻害することで、血圧上昇の抑制が期待される。ACE に着目した血圧調節は、1970 年代初頭、蛇毒から見出された ACE 阻害ペプチドが、高血圧患者への静脈投与で、実際に血圧降下作用を生じさせたことから注目された。それ以降、蛇毒ペプチドの構造を参考に、経口投与で血圧降下作用発揮させる ACE 阻害薬の研究開発が活発化した。

一方で、各種乳酸菌による発酵乳を比較した結果、ペプチド含有量が高いものほど、ACE 阻害活性も高いことが示され、これらの発酵乳を SHR に投与すると、*L. helveticus* 特異的に血圧降下作用が認められた。*L. helveticus* 発酵乳の ACE 阻害活性は、対数増殖期後期から急激に増加し、ACE 阻害作用を持つ血圧降下ペプチドである、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro は、その活性を指標に見出された。これらペプチドは、カゼインが *L. helveticus* のプロテアーゼで断片化された後に、ペプチダーゼの分解を受けることで生成されるが、それ以外にも、ペプチダーゼ活性の低い発酵前期の段階や、*L. helveticus* から抽出した菌体外プロテアーゼのみでカゼインを分解したペプチド分解物にも、SHR で顕著な血圧降下作用があった。そこで、*L. helveticus* は、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro 以外にも、血圧降下ペプチドを生成している可能性が強く示唆されていた。

L. helveticus 発酵乳の安全性については、日本における 90 年以上の食経験があるが、それに加えて動物やヒトでの安全性評価も行われた。*L. helveticus* 発酵乳を、ICR マウスへ 4 週齢から投与した結果、対照群より平均寿命が有意に 8% 延長した。その理由として腫瘍、腎障害、感染症などの遅延が示唆されたため、安全だけでなく、健康効果を保有する可能性も示された。ヒト試験では、健康な成人への過剰摂取および血圧への影響や、高血圧患者での評価が行われ、いずれも安全性に問題ないことが示された。

以上のように、*L. helveticus* 発酵乳は、安全性も高く、血圧降下作用をはじめとする様々な健康機能性を持つ可能性がある有望素材であることが示されていた。

第 2 章では、カゼイン分解物からの血圧降下ペプチドの単離同定を行った。すなわち、乳酸菌 *L. helveticus* CP790 株から単離精製した菌体外プロテアーゼを用いて乳カゼインを分解して得られたペプチド混合物から血圧降下作用を持つ有効成分の同定を行った。最初に、血圧降下作用を示す活性本体が ACE 阻害ペプチドである可能性を再確認した。分解物を逆相 HPLC で分画し、それぞれの ACE 阻害活性を測定した。ACE 阻害活性は IC₅₀ 値(酵素活性を 50% 阻害するペプチド濃度)とした。しかし、いずれの分画物も ACE 阻害活性は非常に低かった。そこで、ACE 阻害活性が弱い血圧降下ペプチドを探索して同定するため、従来の方法とは異なり、高血圧モデルラットである SHR への経口投与による血圧降下作用を指標に、有効成分を直接絞り込んだ。

すなわち、本ペプチド混合物を逆相 HPLC で分画し、それぞれのフラクションを SHR に経口投与して、tail-cuff 法にて血圧値を測定した。最も血圧降下作用が高かったフラクションは、逆相 HPLC を用いて精製を繰り返した結果、最終的に 10 種類の主要ペプチドを単離し、エドマン法による N 末端分析と、アミノ酸組成分析により、各配列を決定した。これらのペプチドを固相法により合成し、SHR に経口投与して降圧値を調べたところ、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の配列を持つペプチドの降圧作用が最も強かった。カゼイン分解物中の本ペプチドの含有量を定量した結果、26 µg / ml であった。本カゼイン分解物は、SHR の体重 1kg あたり 15mg の経口投与で降圧作用が報告されている。さらに、本ペプチドは SHR の体重 1 kg あたり 0.5~2.0 mg の経口投与の範囲で、降圧作用が認められた。以上の結果から、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、*L. helveticus* CP790 株のプロテアーゼによるカゼイン分解物の血圧降下作用の主要成分である事が示された。

第 3 章では、カゼイン分解物から見出された血圧降下ペプチドの作用メカニズム解析を行った。Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は、ACE 阻害活性がほとんど認められなかったため、経口投与後のペプチドの消長を探ることから作用メカニズムを推定すべく、人工消化試験を実施した。

その結果、本ペプチドをパンクレアチンやカルボキシペプチダーゼ A で消化すると、ACE 阻害活性が上昇することが認められた。分解されたペプチドを逆相 HPLC で単離して分析した結果、本ペプチドの C 末端の Gln 残基が分解された Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro が同定された。このペプチドの ACE 阻害活性 (IC₅₀) は 5 μ M であり、分解前のものと比較して活性が 200 倍以上に上昇した。従って、本ペプチドは経口投与後に消化管内で分解を受けて ACE 阻害活性が出現する可能性が示された。さらに Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro を SHR に経口投与して、血圧降下作用を評価した結果、分解前の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln よりも少ない経口投与量でも血圧降下作用が認められた。

一方、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro には、ACE 阻害作用を示す配列が内在している可能性があったため、N 末端、C 末端からアミノ酸残基ひとつずつ削減したペプチドを合成して ACE 阻害活性を測定した。しかし、いずれの合成ペプチドも ACE 阻害活性が低下したために、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro が、活性本体であることが示された。

第 4 章では、発酵を初期段階で停止させた発酵乳から血圧降下ペプチドの単離同定を行った。乳酸菌としては、*L. helveticus* CP790 株から派生した酸生成力の弱い変異株 *L. helveticus* CPN4 株を用い、発酵初期段階である pH 4 付近で止めて一般的なヨーグルトと同等の酸味に改良した発酵乳を用いた。

このヨーグルト様発酵乳は、経口投与により、SHR に血圧降下作用を生じるが、Val-Pro-Pro や Ile-Pro-Pro は含まれておらず、かつ ACE 阻害活性が弱いことから、有効性成分は Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln の可能性が考えられた。しかし、定量の結果、有効量の Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln は含まれておらず、他の有効成分が存在する可能性が示された。そこで、SHR への経口投与による血圧降下作用を指標に活性成分の単離同定を行った結果、顕著な血圧降下作用を持つ新規ペプチド Tyr-Pro を見出した。Tyr-Pro は、SHR の体重 1 kg あたり 0.1~10 mg の経口投与で、血圧降下作用を示した。本ヨーグルト様の発酵乳における Tyr-Pro 含有量は 8.1 μ g / ml であった。また、Tyr-Pro は ACE 阻害活性が 720 μ M と非常に弱いことから、血圧降下作用発揮には別のメカニズムがある可能性が推察された。

第 5 章では、*L. helveticus* 発酵乳の安全性を評価した。*L. helveticus* 発酵乳のホエー成分を粉末化すると、血圧降下作用を発揮するペプチド以外にも、発酵由来の様々な成分が濃縮される。本粉末素材(FM 粉末)の原料となる発酵乳は、食経験から安全性は高いことが想定されるが、血圧降下ペプチドを含めて濃縮された発酵生産物全体の過剰摂取安全性を考察するために、特定保健用食品で原則求められる遺伝毒性(染色体異常試験)、急性毒性(単回投与試験)及び、亜急性毒性(28 日間反復投与試験)を実施し、安全性に係る用量と反応を評価した。FM 粉末用の発酵乳製造に用いた乳酸菌は、Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro の生産能力が高いことで選抜された *L. helveticus* CM4 株を用いた。

その結果、チャイニーズハムスター由来の繊維芽細胞を用いた染色体異常試験では、本素材に起因すると推察される変化は見られなかった。単回投与試験での FM 粉末の SD ラットへの経口投与量は、試験系の最大量(ラットの体重 1 kg あたり 4000 mg 投与)としたが、本素材が起因と判断される変化は見られなかった。28 日間の反復投与試験においては、SD ラットへの経口投与量を、体重 1 kg あたり 500, 1000, 2000 mg の 3 用量としたが、いずれの用量も本素材投与が起因と判断される変化は見られなかった。FM 粉末をラット体重 1 kg あたり 500 mg 経口投与することは、ヒトでの使用予定量の約 10 倍に相当した。以上の結果より、*L. helveticus* 発酵乳のホエー成分を乳酸低減後に粉末した食品素材の安全性は高いことが示された。

本研究の結果、*L. helveticus* のプロテアーゼを用いてカゼインを分解して得られたペプチド混合物と、ヨーグルト様発酵乳において、それぞれ Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と Tyr-Pro のペプチドが、血圧降下作用を発揮する主要成分であることを見出した。これらペプチドは、本カゼイン分解物とヨーグルト様発酵乳を風味良好な機能性食品として実用化する際の有効成分としての活用が期待できる。

また、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln はプロテアーゼ単独の分解で生成されるために、プロテアーゼとペプチダーゼの併用が必要な Val-Pro-Pro や Ile-Pro-Pro よりも、製造方法の単純化や安定化が期待できる。そこで、今後は、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln をより効率的で安価に製造する技術開発を行う必要があると考える。また、本ペプチドの C 末端が分解さ

れて Pro 残基が露出した Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro は、SHR での試験において、分解前のペプチドよりも少ない経口投与量で、血圧降下作用が認められた。従って、予め C 末端の Gln 残基を分解もしくは、直接生成する技術も研究することで、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro を活用した血圧降下作用の強い機能性食品の提供や、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln よりも少ない摂取量で、かつ同等の血圧降下作用が得られる機能性食品の開発につながる事が期待できる。

作用メカニズム研究では、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln が、消化酵素で分解されて ACE 阻害作用を発揮する、プロドラッグタイプのペプチドであることを見出した。このことは、食品として経口摂取するペプチドのなかには、消化管内で酵素分解を受けることで、本来保有していた生理活性が消失してしまうものだけではなく、新たに生理活性が発現するものがあることを示した。従って、新たに機能性ペプチドを探索する際に役立つ知見になると考える。

L. helveticus のヨーグルト様発酵乳から見出されたペプチド Tyr-Pro は、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と同様に顕著な血圧降下作用を持つが、ACE 阻害作用が弱いために他の作用メカニズムも持つ可能性が示された。血圧降下作用において、ACE 阻害以外のメカニズムとしては、γ-アミノ酢酸 (GABA) のように、腸管から吸収されて交感神経を抑制することで血圧低下作用を示す例が知られている。Tyr-Pro においては、別の研究で、ラットへの交感神経系の抑制作用が見出されているが、Tyr-Pro の交感神経系抑制作用と血圧降下作用との直接的な関連性については、現在調べる限り報告がないために、今後はこれらの関係を詳細に調べる必要があると考える。

さらに、*L. helveticus* が生成するその他成分を含めた発酵乳の安全性について評価した。粉末化された発酵乳ホエーを用いて、正常ラットを用いた遺伝毒性、急性および亜急性毒性を評価した結果、いずれも、試験系で設定できる最大限の量を投与しても、それに起因する毒性はなく、安全性が非常に高いことが考察された。本知見は、食品由来の ACE 阻害ペプチドを機能性食品などに応用する際に必要となる、安全性評価のための試験デザインの設定や、安全性理論構築に活用できると考える。

本研究の結果、乳酸菌 *L. helveticus* は、Val-Pro-Pro や Ile-Pro-Pro 以外にも、SHR において同等の血圧降下作用を発揮する機能性ペプチドである、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と Tyr-Pro を生成することを見出した。さらに、これらのペプチドは、SHR への経口投与試験において、ヒトでの効果が実証されている Val-Pro-Pro や Ile-Pro-Pro とほぼ同じ投与量で、同レベルの血圧降下作用が確認されていることから、ヒトでも、実用的な摂取量で効果を発揮する可能性が高いと考える。そして、実用化されれば、風味に優れた機能性食品開発に役立つことが期待できる。

また、Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln と Tyr-Pro は、従来の ACE 阻害活性が高い血圧降下ペプチドと比較して、いずれも、機能性発揮メカニズムについて示唆に富むことから、今後の研究で新規な血圧降下ペプチドを探索する際には、基礎的知見として役立つものであると考える。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りましたカルピス（株）元役員 高野俊明氏、研究戦略部 山本直之博士へ厚く御礼申し上げます。

本論文の作成に当たり、明治大学農学部 瀧瀬雄三教授、溝口康講師、川口真以子講師、佐々木泰子准教授より、多大なるご指導を賜りましたことを心より感謝いたします。

そして、本論文作製へのご理解とサポートを頂きました、カルピス（株）発酵応用研究所の宮崎博所長、大木浩司博士、中村康則博士に心より感謝いたします。

最後に、本論文の作成に関して温かく見守り、支えて頂いた私の家族に対して、心より感謝いたします。

2014/1/22

前野正文

Appendix

(投 稿 論 文)

1. Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science* 1996; 79: 1316-1321.
2. Maeno, M., Mizuno, S., Mennear, JH., Bernard BK. Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): VIII. Assessment of cytotoxicity and clastogenicity of tripeptides-containing casein hydrolysate and *Lactobacillus helveticus*-fermented milk powders in chinese hamster lung cells. *International Journal of Toxicology*. 2005; 24 (Suppl. 4): 97-105.
3. Maeno, M., Nakamura, Y., Mennear, JH., Bernard BK. Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): III. Single- and/or repeated-dose toxicity of tripeptides-containing *Lactobacillus helveticus*-fermented milk powder and casein hydrolysate in rats. *International Journal of Toxicology*. 2005; 24 (Suppl. 4):13-23.
4. Yamamoto, N., Maeno, M., Takano, T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*. 1999; 82: 1388-1393.

(参 考 文 献)

血 圧 降 下 剤 及 び そ の 製 造 法 特 許 公 報 . 特 許 第 3364579 号 .

血 圧 降 下 剤 及 び そ の 製 造 法 特 許 公 報 . 特 許 第 3665663 号 .

血 圧 降 下 剤 及 び そ の 製 造 法 特 許 公 報 . 特 許 第 3782837 号 .

Note

Production of Antibacterial Peptide 'Apidaecin' Using the Secretory Expression System of *Streptomyces*

Masafumi MAENO, Seiichi TAGUCHI, and Haruo MOMOSE*

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo, Noda, Chiba 278, Japan

Received December 25, 1992

Apidaecins (Ia, Ib, II), found in immune honeybee lymph and extensively studied by Casteels *et al.*,¹⁾ are unique peptides composed of 18 amino acid residues containing 6Pro and 3Arg, and are reported to inhibit the growth of, especially, Gram-negative bacteria bacteriostatically. We have produced *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI)-apidaecin fusion protein in a large amount,²⁾ in which apidaecin was joined to SSI *via* four amino acid residues inserted as the recognition and cleavage site for blood coagulation factor Xa.³⁾ Although the antibacterial activity could be found in the mixture of the fusion protein digested with factor Xa, the satisfactory isolation of apidaecin was not achieved, probably because of non-specific cleavage by factor Xa under the reaction conditions used. This communication describes the change of cleavage method from the enzymatic digestion to a chemical one with CNBr, and also describes the isolation and purification of the recombinant apidaecin and a new finding on its antibacterial action.

To obtain a SSI-apidaecin fusion protein, we first constructed a secretory expression vector, pJS205 Δ EAP1M, and introduced it into *S. lividans* 66 as presented in Fig. 1. The Met codon added in front of apidaecin gene corresponds to the cleavage site for CNBr in the fusion protein to be produced.

Lanes from 2 to 5 in Fig. 2 show the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of SSI-apidaecin fusion protein in each step of purification procedure started from culture supernatant (expressed amount; 72 mg/liter of culture medium, lane 2), followed by ammonium sulfate precipitation (recovered sample: 40 mg, lane 3), ion-exchange chromatography (recovered: 24 mg, lane 4), and reverse-phase HPLC (lane 5). On lanes 4 and 5, small bands were observed at slightly lower molecular weight positions. As these proteins showed positive reaction against anti-SSI antiserum by western blotting analysis (data not shown), it seems that the fusion

protein was degraded, although slightly, by a weak protease²⁾ extracellularly produced by *S. lividans* 66.

This fusion protein was again purified by reverse-phase HPLC, and cleaved with CNBr to isolate apidaecin. A fraction was found to have antibacterial activity by the growth inhibition assay,²⁾ and the amino acid composition of the peptide isolated from the fraction was proved to be identical with the value expected from the DNA sequence designed for apidaecin-Ib (data not shown). The maximum efficiency of the cleavage reaction was 30%, giving a satisfactory yield. It was more efficient than the enzymatic cleavage by factor Xa, which gave heterogeneous peptides together with apidaecin itself.

Lane 6 of Fig. 2 shows the gel pattern of the CNBr digest, in which two distinct bands (a, b) are observed; one is slightly larger and another is smaller than authentic SSI in molecular weight. These two bands seem to correspond to major halves of the fusion protein cleaved at the carboxy side of a Met residue. The larger one must be SSI with the extra tail of Ile-Glu-Gly-Arg-Met at the carboxy terminus (band a), so apidaecin peptide with no Met residue must be released at the same molar ratio (a band corresponding to apidaecin cannot be detected on the gel pattern owing to the small molecular size of 18 amino acid residues).

The purified recombinant apidaecin was examined for its antibacterial activity against *Bacillus* strains (Gram-positive) as well as *E. coli* (Gram-negative) as described before.²⁾ The result was shown in Table, in which bacterial growth was observed at various concentrations (0–10 μ g/ml) of the recombinant apidaecin. It was found that the growth of *B. subtilis* ISW1214⁵⁾ was inhibited by 10 μ g/ml of apidaecin, although the strain was one tenth less sensitive than *E. coli* JM109. Two other *Bacillus* strains^{4,6)} were insensitive to 10 μ g/ml of apidaecin.

This finding provoked our interest in the reason for the difference

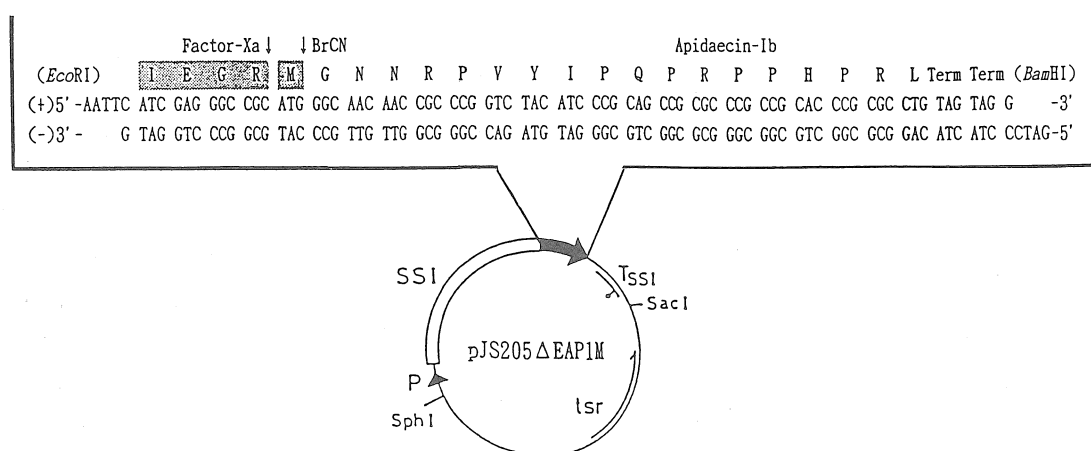


Fig. 1. Structure of Plasmid pJS205 Δ EAP1M for the Secretory Expression of the SSI-Apidaecin Fusion Protein in *S. lividans* 66.

The open and solid boxed regions represent the SSI structural gene, and the synthetic apidaecin gene, respectively. Arrows indicate the direction of the transcription of each gene. P and T_{SSI} denote the promoter and terminator of the SSI gene. mel, tyrosinase gene; tsr, thiostrepton resistance gene.

* To whom correspondence should be addressed.

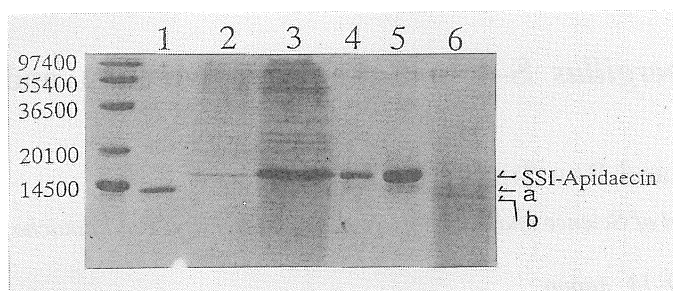


Fig. 2. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for SSI-Apidaecin Fusion Protein.

Lane 1, authentic SSI; lane 2, culture supernatant of *S. lividans* 66 carrying pJS205ΔEAP1M; lane 3, sample precipitated with ammonium sulfate; lane 4, sample purified by ion-exchange chromatography; lane 5, sample purified by reverse-phase HPLC; lane 6, sample digested with CNBr.

in sensitivity. The semi-quantitative comparison of the level of extracellular protease action in these strains was *B. amyloliquefaciens* > *B. subtilis* 168 ≥ *B. subtilis* ISW1214 > *E. coli* JM109, when skim milk was used as the substrate (data not shown). Considering that strain ISW1214 is a mutant derived originally from strain 168, the protease action of strain ISW1214 against apidaecin may be weaker than that of the ancestral strain 168. If this is the case, the mode of action of the antibacterial peptide might be intrinsically common for both Gram-negative and Gram-positive bacteria, although it is interfered with by protease(s) excreted by the target bacteria. This hypothesis will be tested by investigating mutants essentially devoid of apidaecin-degrading ability.

Acknowledgments. We are grateful to Drs. I. Hirao and S. Kojima of Dr. Kumagai's laboratory, Department of Industrial Chemistry, the University of Tokyo for their experimental help with oligonucleotide

Table Antibacterial Activity^a of Apidaecin against Gram-positive *Bacillus*

Strain	Bacterial growth concentration of apidaecin (μg/ml)			
	0	1	5	10
<i>B. subtilis</i> 168 ⁴⁾	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i> ISW1214 ⁵⁾	+	+	+	— ^b
<i>B. amyloliquefaciens</i> ⁶⁾	+	+	+	+
<i>E. coli</i> JM109 ^c	+	—	—	—

^a Antibacterial activity was assayed by adding apidaecin to 100 μl of 10% nutrient broth (NB) medium inoculated with 10⁴/ml of test strain, followed by culturing overnight at 37°C under static conditions in a multi-titer plate with 96 wells.

^b +, growth was observed; —, no growth was observed.

^c Used as the reference.

synthesis and amino acid analysis. This work was supported in part by grants from the Iwatani Foundation and also from the Japan Securities Scholarship Foundation.

References

- 1) P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, and P. Tempst, *EMBO J.*, **8**, 2387–2391 (1989).
- 2) S. Taguchi, M. Maeno, and H. Momose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 749–753 (1992).
- 3) K. Nagai and H. C. Thøgersen, *Nature*, **309**, 810–812 (1984).
- 4) H. Momose and Y. Ikeda, *Nature*, **186**, 567–568 (1960).
- 5) H. Ishiwa and H. Shibahara, *Jpn. J. Genet.*, **61**, 515–528 (1986).
- 6) H. Momose, H. Nisikawa, and N. Katsuya, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **11**, 211–220 (1965).